



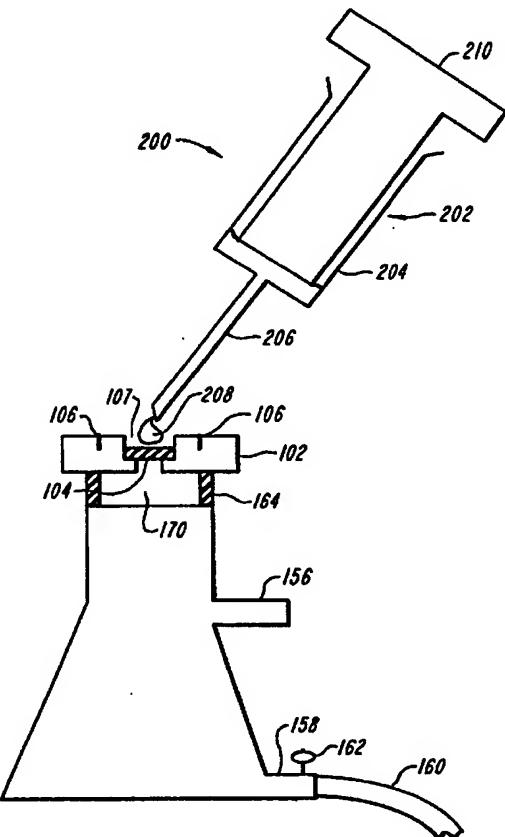
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>G01N 21/35</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 96/41153</b> (43) International Publication Date: 19 December 1996 (19.12.96)
(21) International Application Number: <b>PCT/US96/09304</b>			(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 6 June 1996 (06.06.96)			
(30) Priority Data: 08/485,366 7 June 1995 (07.06.95) US			
(71) Applicant (for all designated States except US): INPHOCYTE, INC. [US/US]; 350 Main Street, White Plains, NY 10601 (US).			
(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): ZAKIM, David, S. [US/US]; 15 Cole Drive, Armonk, NY 10504 (US).			
(74) Agents: KENNARD, Wayne, M. et al.; Hale and Dorr, 60 State Street, Boston, MA 02109 (US).			

(54) Title: BIOLOGICAL CELL SAMPLE HOLDER FOR USE IN INFRARED AND/OR RAMAN SPECTROSCOPY ANALYSIS

## (57) Abstract

A biological cell sample holder for use in infrared and/or Raman spectroscopy. The sample holder includes a rectangular body that has a stepped opening through the center. The body is transparent to infrared and Raman energy. A window is disposed in the stepped opening. The window has pores of a predetermined size to allow fluid to pass through the window but retain cells of interest on the window. There also is an assembly that is used to cause the collection and concentration of cells on the window. The assembly includes a flask with a first outlet that connects to a vacuum source and a second outlet that connects to a drain system. The flask has an open top end. A frit sealingly engages the top end of the flask. The frit is hollow and has a nipple extending from the top surface of the frit. The frit has a top surface that is adapted to fit the sample holder.



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

# BIOLOGICAL CELL SAMPLE HOLDER FOR USE IN INFRARED AND/OR RAMAN SPECTROSCOPY ANALYSIS

## 5 Field of the Invention

The present invention relates to sample holders that are used for holding biological cells that are to be analyzed by infrared and/or Raman spectroscopy.

## Background to the Invention

10 Examination of cells and tissues, referred to here as diagnostic pathology, remains a critical step for reaching a medical diagnosis and selecting the most appropriate therapy for patients. The practice of pathology is limited in reaching definitive diagnoses in many instances because of the difficulty in identifying morphological changes in individual cells that correlate with clinical hallmarks of disease. This is an especially significant problem when cells and not intact blocks of tissue are available for examination.

15 The accuracy and clinical value of microscopic examinations of cells, which may form a basis for making definitive pathological and clinical diagnoses, is becoming increasingly important and may provide a method of especially detecting stages of precancer and cancer without the need for tissue. This method also is attractive because cells are easier, safer, and cheaper to obtain than tissue, which is available usually via 20 surgical procedures.

25 The easy accessibility to cells as compared to tissue makes it possible to use such cells for screening healthy populations for evidence of early stages of diseases, such as cancer. Cervical cells, for example, are examined to detect precancer and/or early stages of cancer of the cervix; cells in urine are examined for evidence of early stages of urogenital cancer; cells in sputum are examined for early diagnosis of lung cancer. These kinds of "cytological" tests are becoming increasingly important in the practice of medicine and for 30 public health. This is true despite the evidence that the clinical value of cytological examinations is limited and often suspect because of the high incidence of false-negative results. Cytologic testing also is beset with a high incidence of false-positive results. Both of these results impact negatively on patient confidence and add unnecessarily to the costs of health care.

5        The incidence of cancer is rising as the incidence of other diseases decrease and people live longer. As such, cancer will continue to be a major health problem for years to come. The best approach to managing the burden of the cancer problem is to find the disease in its precancerous stages and then to prevent the emergence of frank cancer from precancerous cells. The way to this end is better methods for detecting cells in a precancerous stage of disease and for showing the extent to which precancerous disease approaches frank cancer.

10      An alternative to the traditional method of subjective, microscopic examination of stained cells for detecting precancerous disease and early stages of cancers is to assess the chemical and physical properties of the molecules within cells. The logic of this approach is that normality or abnormality in the chemical and physical properties of the molecules in cells is the basis for health and disease. Changes in the chemical and physical properties of molecules in cells precede and underlie the changes in morphology that pathologists search for microscopically as evidence of disease.

15      It is known that the vibrational spectra of whole cells, e.g., infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, are sensitive methods for measuring whether the molecules in cells are normal or abnormal. It also is known that abnormalities in the vibrational spectra of cells correlate with pathological diagnoses made by microscopic examination of the tissues and cells. Copending application serial no. \_\_\_\_\_, titled A System and Method for Diagnosis of Disease by Infrared Analysis of Human Tissues and Cells, and filed June 7, 20      1995, demonstrates that infrared spectroscopy of cells detects disease that cannot be detected by microscopic examination of cells, detects the evolution of normal cells through the continuum of the precancerous changes that eventuate in cancer, detects the evolution of cells through stages of dysplasia that proceeds by different detailed pathways in the accumulation of genotypic and phenotypic abnormalities, and detects the presence of viral infection of cells.

25      The use of spectroscopy for studying cells, i.e., describing in detail how light of different frequencies interacts with the molecules in cells, is in its infancy as a medical technology. There is, however, a need for a rapid, inexpensive method for the preparation of cells for examination by vibrational spectroscopy. Conventional methods of preparing cells for pathological examination, e.g., fixing, embedding, and staining of cells, prior to 30      microscopic examination are not particularly useful for preparing cells for spectroscopic

examination. Moreover, the methods used by spectroscopists to study inanimate matter were not useful for preparing cells for vibrational spectroscopy examination for medical diagnosis. This is because such methods are time consuming, labor intensive, and expensive. Also, what is being used by spectroscopists for study of cells requires a high 5 degree of diligence and expertise on the part of the operator, which further inhibits the general application of the methods of vibrational spectroscopy for the diagnosis of disease.

Principally, there are three known ways to prepare cells for examination by 10 vibrational spectroscopy. The first is no preparation at all. This method requires that cells in their natural state be added to a suitable sample holder and analyzed in the presence of small amounts of water. Second, cells may be placed on a sample holder and any water removed by drying. Third, cells may be isolated, dried, and incorporated into KBr discs. Moreover, the method of the direct addition of cells to infrared windows (of BaF<sub>2</sub>) by 15 cytocentrifugation also has been used.

All of these methods have significant problems such as expense, time, and limited 15 availability of qualified people to do it. However, cells, as they are collected from tissues, from patients, from the body fluids of patients, from cells in culture, or otherwise, cannot be used directly in sample preparation method just described.

In order to put the problems in perspective, the specification will consider, for 20 example, the problem of examining cervical cells by infrared spectroscopy. Cells are collected from the cervix by scraping with a brush or spatula. For conventional cytology, the cells are smeared directly from the brush or spatula onto glass slides. This method can 25 not be used as preparation method for vibrational spectroscopy because the beam of light in the spectrometer cannot cover the area of the typical smear. Moreover, there is difficulty in controlling the thickness of cells and mucous deposited on the slide. There also may be some difficulty in fixing cells with materials that can be washed off completely so as not to interfere with spectral analysis of the cells. Lastly, materials that are used for slide material, which are transparent to mid-infrared frequencies of light, are relatively expensive.

Rather than smearing, cells can be removed from the collecting brushes and 30 spatulas by vigorously shaking them in a fluid medium. Next, the cells in the fluid medium are concentrated and then examined. This concentration is independent of the exact set of conditions under which spectra will be obtained. If the concentrated cells are examined directly without drying, the amount of water relative to cells must be quite small or the

water will detrimentally effect the result because of water's avid absorption of infrared light.

As described, cells may be prepared by drying and then examining the dried cells. Examination of dried cells also cannot be used for vibratory spectroscopy without finally 5 concentrating the cells. Concentration is necessary because only small volumes of cellular suspensions (in the microliter range) can be added at one time to suitable sample holders for vibrational spectroscopy. Adding an appropriate number of cells to suitable infrared sample holders, for example, depends on adding, serially, several microliter aliquots of cells in suspension, allowing each aliquot of the sample to dry on the sample holder before adding the next aliquot. This is a very time consuming process that is not appropriate for 10 clinical use, i.e., it takes as long as 20 to 30 minutes, for small volumes of sample (about 20  $\mu$ l) to dry.

Even with the dried cells, there will be artifacts unless the cells are fixed. Fixation 15 of cells in this context adds considerable complexity, labor, cost, and the requirements of skill and diligence. Fixatives that are contemplated also must be removed from the cells by extensive washing prior to collecting spectra from the cells. This step or set of steps cannot be accomplished within the confines of currently available sample holders usable for vibratory spectroscopy.

A sample preparation method that accomplishes concentration and drying involves 20 the incorporation of cells into KBr disks. This method depends on the prior concentration of cells followed by drying. Using this method, one gains no advantage over the direct addition of concentrated cells to sample holders.

Concentrating cells may be accomplished by centrifugation, which isolates the cells 25 from the suspending fluid. The concentration of cells is not difficult to achieve by centrifugation, but it requires specialized equipment, time, and labor. Also, the need to concentrate cells by centrifugation makes it difficult to automate the process of adding cells to the appropriate sample holders. For example, in the case of cervical cells suspended in some type of aqueous medium or cells suspended in body fluids, the suspension of cells is 30 centrifuged and the supernatant removed by aspiration or decantation. In the case of cervical cells, the cells are suspended in a relatively small volume of fluid, which is easy to remove by centrifugation in small centrifuges. When the cells are from body fluids, however, the volume of fluid can be considerable, e.g., a liter or more, which complicates

the process of concentration by centrifugation.

Once cells are concentrated as a pellet in the bottom of a centrifuge tube, a small aliquot of concentrated cells is pipetted directly onto a variety of suitable sample holders. The cells can be examined in the wet state or the cells can be dried on the sample holder 5 prior to examination. Examination of cells in the wet state requires a second window for the sample holder in order to confine the wet sample to a closed system, which increases costs and labor in cleaning the sample holder.

A complication of examining cells in the dry state, already stated, is that drying a sample of 20 to 40  $\mu$ l on a sample holder at room temperature requires 20 to 30 minutes. 10 During this time unfixed cell, autodigest their components, which introduces artifacts into the spectra collected from such cells.

The problem caused by allowing unfixed cells to stand at room temperature, even for relatively brief times, is illustrated by the spectra shown in Figure 1. The spectrum in the solid line is an infrared spectrum of cervical cells collected 10 minutes prior to the 15 collection of the spectrum in the dashed line on the same sample of unfixed cells on the same sample holder. Note how the spectrum in the region of 1023  $\text{cm}^{-1}$  was altered by the metabolic activity of the unfixed cells.

Figure 2 compares two spectra of unfixed cervical cells obtained within a few hours of each other. Here again, there are significant changes in the spectra of the unfixed cells over time.

20 Figure 3 compares spectra of cervical cells that were unfixed (dashed line) and fixed (solid line). The time differential between the unfixed and fixed samples was 30 minutes, which was the duration of time required to add cells to the window of a convention infrared sample holder and to dry them at 20° C. Figure 3 shows how fixation of cells prevents short term, metabolically-induced changes in the spectral features of unfixed cervical cells.

25 These examples make plain that the spectral examination of cells is best carried out on fixed cells because fixing prevents the metabolic function of cells. Otherwise, there is no certain way to control for the effects of cell viability on spectral features after cells are added to the sample holder. These examples also demonstrate that in the absence of prior fixation, heated-drying is not advantageous because heating speeds up the rate of autodigestion of unfixed cells.

30 The foregoing provides evidence that conventionally, the examination of human

cells, or cells derived from any other source, via infrared spectroscopy is based on preparing samples individually, one at a time, in a time consuming way. These prior methods not only require that multiple steps to transfer cells from suspensions to a suitable sample holder but also end up introducing artifacts into the analytical spectra unless the 5 cells are fixed. These methods are expensive, time-consuming, labor intensive, not amenable to automation, require centrifuges, and depend on the skill and diligence of the operator. Such methods also do not lend to the rapid preparation of large numbers of samples at low cost with minimal skill and diligence by the operator.

Conventional methods for detection of cervical cancer accounts for between 10 60,000,000 and 80,000,000 examinations of cervical cells each year in the U.S. The limitations referred to above prevent the full exercise of the capacity of the technology of vibrational spectroscopy which could replace conventional examinations. In particular, the limitations of the sample holder, loading of the sample holder with cells, and fixation of these cells remain paramount issues to be solved.

A separate but related difficulty in examining cervical cells, either by standard 15 cytology or vibrational spectroscopy, is that the cervix is not a completely homogeneous organ. For example, it is recognized and recommended that samples of cells be obtained and examined separately from the endo- and the exocervix. This recommendation is almost never followed because of the economics of carrying out the test. These two samples of 20 cells per patient require two separate examinations and double the real cost of performing the test. Therefore, the method of detecting early stages of cancer of the cervix or precancerous disease of the cervix is compromised by taking only one sample that may 25 contain a mixture of endo- and exocervical cells.

The method of vibrational spectroscopy is not only inherently superior to cytology as a method for detecting disease in cells, it also is inherently cheaper to examine cervical 30 cells, or other types of cells, than standard cytological methods. But the difficulty of preparing samples via conventional methods also will compromise the total amount of information that can be collected from cells using infrared spectroscopy. The economics of preparing samples for spectroscopic examination, in the absence of better methods for preparing these samples, will dictate the collection of only one sample of cervical cells per patient per examination or that specimens from the endo- and exocervical regions will be combined prior to preparing samples and examining their combined vibrational spectra. As

such, the method of preparing samples for spectroscopic examination will have a significant impact on the collection of spectral data and on the amount of clinically useful information that can be derived from proper sampling of the cells of patients.

There is a need, therefore, for better methods for processing cells from the point of 5 their collection from patients to their actual analysis by vibrational spectroscopy.

#### Summary of Invention

The present invention is a biological cell sample holder for use in infrared and/or Raman spectroscopy. The present invention allows the addition of a suspension of cells and other components in fluid medium to the window of an infrared sample holder that is porous and selectively retains cells. According to the sample holder of the present 10 invention, cells are trapped on the surface of the window while all other components are filtered through the window. This obviates the need to concentrate cells by some method independent of placing them on the window. At the same time, trapping the cells on a porous window makes it possible to wash the cells extensively, treat them chemically in many different ways, and then to wash away any contaminants that might alter the 15 vibrational spectra. This includes the ability to remove any contaminants that might be added to the collecting medium to facilitate preparation of the cells.

The present invention requires no change in the manner in which doctors collect 20 cells from patients. For example, with respect to the cervix, doctors can collect cells by the method of the current Pap test, by fine needle aspiration of solid tissues, or with respect to other areas, in conventional ways from the sputum, urine, cerebrospinal fluid, ascitic fluid, pleural fluid, or any other body fluid. Moreover, the present invention also is directly applicable to the collection of cells in any form that may exist or can be made to exist in a 25 fluid medium.

The present invention provides a novel method for adding collected cells to suitable sample holders that hold the cells in an analytical beam of light for the purpose of obtaining 25 a vibrational spectrum of the cells. The vibrational spectrum can be in any range of the infrared region and can be obtained by infrared, Raman or resonance Raman spectroscopy. The present invention also can be applied to collecting spectra by transmission or reflectance spectroscopy.

The present invention includes sample holder with a window region. Once the cells 30 to be analyzed are placed on the window region, an analytical light beam is shown through

cells and the window region. The beam of analytical light must pass without interference through the window material. The window region is transparent to light of the frequencies of interest for the analysis to be performed and does not react with components in the sample holder.

5 In the present invention, the window region, in addition to the optical requirements just described, serves the purpose of providing a means for concentrating the material of interest as it is placed on the window and then a means for treating the sample on the window in a wide range of different ways, all of which enhance the amount of spectral information that can be collected from the cells.

10 Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows a first comparison of spectral waveforms for unfixed cells.

Figure 2 shows a second comparison of spectral waveforms for unfixed cells.

Figure 3 shows a comparison of spectral waveforms for fixed and unfixed cells.

Figure 4A shows a top view of the sample holder of the present invention.

15 Figure 4B shows a cross-sectional view of the sample holder of the present invention at 4B-4B of Figure 4A.

Figure 5A shows the vacuum filtration system of the present invention.

Figure 5B shows the vacuum filtration system of Figure 5A with the sample holder of the present invention mounted on it.

20 Figure 6 shows a fluid suspension containing collected cells in a syringe with the fluid suspension being added to the sample holder of the present invention.

Figure 7 shows the sample holder of the present invention with a detachable funnel connected to it.

25 Figure 8 shows a second embodiment of the system of the present invention for collecting and concentrating cells.

Figure 9 shows a top view of the frit in the second embodiment of the system shown in Figure 8.

Figure 10 shows a top view of the window and non-porous transport support.

Figure 11A shows a top view of a second embodiment of a sample holder of the present invention.

30 Figure 11B shows a bottom view of the second embodiment of the sample holder

of the present invention.

Figure 12 shows an assembly for removing cells from collecting devices.

Figure 13 shows a third embodiment of the system of the present invention for collecting and concentrating cells.

5 Figure 14 shows a system and method for automatic or semi-automatic collection and concentrating cells.

Description of the Invention.

10 The present invention is a biological cell sample holder for use in infrared and/or Raman spectroscopic analysis. The present invention principally will be described in the context of processing cervical cells for analysis by vibrational spectroscopy. However, it is understood that the present invention applies to any type of cell or source of cells. For example, cells from any body fluid, including blood can be processed in the same manner as cervical cells. Further, cells in experimental systems, e.g., cells in culture, whether human cells, animal cells, plant cells, normal cells, and diseased cells, can be processed by the present invention.

15 A top view the sample holder of the present invention is shown in Figure 4A. Figure 4B is a cross-sectional view of the sample holder of the present invention at 4B-4B of Figure 4A. Referring to these Figures, body 102 of sample holder 100 serves as a structure upon which a sample may be placed. Body 102 has stepped opening 107 located in the center. Stepped opening 107 has upper section 108 and lower Section 110. Annular ledge 20 112 is formed between the two sections. Window 104 is disposed in the opening and is supported by annular ledge 112.

25 Samples to be analyzed are placed on Window 104. Analytical light illuminates the cells on the window to obtain spectral information. Window 104 of sample holder 100 is transparent to predetermined frequencies of light. Moreover, the window is porous so that water and materials dissolved in water will pass through it. The pores are not large enough, however, to permit passage of cells. In fact, the pores of the window will allow fluid to pass through the window at pressures that will not rupture window 104 or tear it from body 102 of the sample holder 100.

30 Body 102 also includes groove 106 disposed concentric with stepped opening 107. Groove 109 is for the attachment of a funnel (not shown) that is used for collecting cells from large volumes of fluid material, as will be described. Groove 116, however, is not

required to practice the present invention.

Referring to Figure 5A, the vacuum filtration system of the present invention is shown generally at 150. Vacuum filtration system 150 is used for loading cells in suspension onto window 104. Vacuum filtration system 150 includes vacuum flask 152 and frit 164 that is disposed in opening 154 at the top of vacuum flask 152.

Vacuum flask 152 has vacuum outlet 156 which is connected to a vacuum pump (not shown) that will draw a predetermined level of vacuum in vacuum flask 152. Vacuum flask 152 also has drain outlet 158 to which drain line 160 connects. Valve 162 is disposed in drain line 160 to control fluid drainage from vacuum flask 152.

Frit 164 has an outside contour and shape that permits it to sealingly fit in top opening 154 of vacuum flask 152. Frit 164 has top surface 166 and opening 170 in the bottom. Hollow nipple 168 extends upward from top surface 166. Hollow nipple is in fluid communications with opening 170. Frit 164, preferably is made from sintered glass.

Referring now to Figure 5B, vacuum filtration system 150 is shown with sample holder 100 disposed on it. As is shown, hollow nipple 168 is dimensionally shaped to fit into lower section 110 of stepped opening 107 in body 102 of sample holder 100, and up against the bottom of window 104.

Even though the Figures 5A and 5B show frit 164 with hollow nipple 168 extending from up surface 166, the present invention contemplates other configurations of frit 164, which includes without limited a flat frit with an opening to accommodate the size of window 104 and window 104 is disposed flush with the bottom of body 102.

Again referring to Figures 5A and 5B, constructing frit 164 to the exact contour of body 102 and window section 110 of the sample holder 100 insures efficient application of suction pressure through window 104. As such, negative pressure that is applied through vacuum flask 152 does not rupture the window or tear it from body 102. Therefore, all that happens when the vacuum is applied through causing suction through vacuum outlet 156 is window 104 of sample holder 100 is drawn tightly to the surface of the sintered glass frit 164.

Cells in suspension may be added to the center of the window by any convenient method such as by a pipette (not shown). The existence of upper section 108 of stepped opening 107 prevents the wetting of body 102 of sample holder 100 as suspensions of cells are added to window 104.

As the cells in a fluid medium are added to window 104, the fluid medium and dissolved components are drawn through the pores of window 104 by vacuum pressure. Since the pores of window 104 have the appropriate size, the cells become trapped at the surface of window 104. The fluid suspension is added to window 104 at a rate that will 5 permit the fluid medium to filter through window 104 and collect in vacuum flask without wetting the sample holder. This novel configuration allows for the simultaneous concentration and addition of cells to window 104. Accordingly, there is no need to concentrate the cells in the suspension prior to adding them to window 104 of a sample holder 100.

10 Another aspect of the vacuum filtration system 150 is that the simultaneous addition of cells to window 104 and drying of such cells is accomplished by application of negative pressure to flask 152. As such, window 104 of sample holder 100 facilitates the processing of cells for spectral examination by rapidly and inexpensively collecting and concentrating the cells. Once cells have been added to window 104 of the sample holder 100, the cells are analyzed using infrared and/or Raman spectroscopy.

15 Referring to Figures 4A, 4B, 5A and 5B, aspects of sample holder 100 will be described in greater detail. Body 102 of sample holder 100 preferably is constructed of a molded plastic. However, it is understood that other methods may be used. For example, body 102 of sample holder 100 could be constructed of paper or cardboard, or other suitable material. Window 104 may be constructed of any suitable material that has the necessary 20 optical properties for vibrational spectroscopy. This material also must be porous. The upper limit to the pore size must be less than the diameter of cells. Examples of suitable materials for window 104 are microporous non-woven or fibrous webs of glass, polyethylene, polypropylene, and alumina.

25 Window 104 may be thin for some application and thicker for others. The thickness depends on the optical limitations imposed by the type of analysis that is to be conducted and the nature of the material being analyzed. For example, windows constructed of polyethylene have strong vibrational bands in the mid-infrared region. If such windows are relatively thick in the 2-3 mm ranges, they will not transmit enough light in the mid-infrared to be useful. However, if these materials are thin sheets in 10 to 20  $\mu\text{m}$  range, they are excellent windows for infrared spectroscopy of cells and tissues. By contrast, thick 30 layers of glass, as windows, do not create any problem for near infrared spectroscopy, or

Raman or resonance Raman spectroscopy.

Before the cells are analyzed, they may be washed to remove any materials which will impact negatively on the spectral response from the cells or materials under analysis. Washing of the cells may be accomplished by using a pipette of wash solution of any 5 volume. The washing step is repeated until the undesired materials are washed from the cells.

10 The fixation of cells provides a method to obtain a better response from the vibrational spectroscopic analysis of cells. Fixation is not used primarily in structures in which spectral examinations are conducted immediately after the collection of cells, otherwise fixation is a preferred method. However, in an automated system of analysis, in which cells from several samples are prepared and allowed to stand prior to examination 15 by a spectrometer, e.g., in large central laboratories, fixation is used to assist in securing the successful use of spectroscopic methods to large numbers of samples.

15 Another method of processing the cells to be analyzed is to freeze them until they are prepared for examination by vibrational spectroscopy. Once unfrozen the cells are then prepared and maintained at low temperatures until the time of analysis. This, however, adds enormous complexity and expense to the infrared or Raman spectroscopic examination of cells and tissues.

20 In cases when a fixative material is added to the cells, it is important to remove the fixative prior to spectral examination so that artifacts based on the fixative are not present. The fixative may be removed by washing cells as extensively as desired once they are trapped on window 104 of sample holder 100. Specifically, the fixative is removed by 25 washing window 104 with appropriate solutions.

25 In collecting of cervical cells, the cells are scraped from the cervix with brushes and spatulas. In preparing standard cytological smears, the cells attached to the brushes and/or spatulas are smeared onto glass slides. For the purpose of spectral analysis, however, the collecting devices are placed in capped bottles containing a buffered salt solution plus a fixative. Vigorous shaking of the sealed bottles displaces the cells from the brushes and spatulas and suspends the cells in the fluid in the collecting bottles. The suspension of cells can be aspirated from the bottles and added to window 104 of sample holder 100. The cells are fixed when they are removed from the bottles in which they are collected.

30 Cells collected by fine needle aspiration from the bottles are aspirated into a fluid-

filled syringe. The cells collected in this manner can be added directly to window 104 of sample holder 100. This may be done within seconds of cell collection. This action is shown in Figure 6 at 200.

In Figure 6, fluid 208 from syringe 202 is expelled from reservoir 204 through 5 needle 206 upon positive pressure on plunger 210 of syringe 202. Cells can be fixed once they are placed on window 104 of sample holder 100 to avoid an intermediate step of adding the cells to fixative and then adding the suspension of cells in fixative to window 104. Preferably, fixation is accomplished by the addition of fixative to window 104 of sample holder 100. The vacuum is turned off to control the duration of contact between the fixative and the cells. After this period, the vacuum is turned on to remove the fixative. The 10 excess fixative is then washed from the cells under vacuum by an appropriate wash solution. Also, once fixation is complete a series of washing steps take place to remove fixative from the cells.

The present invention facilitates the addition of cells to window 104 of sample holder 100 in a manner to speed up and simplify sample preparation for spectral analysis. 15 The present invention also enhances the user's ability to remove biological substances from sample holder 100 that are of no interest spectrally or that might interfere with the spectral analysis of the cells. This could be, for example, the desire to diminish the amount of mucous in the sample on window 104. The user could do this by repeatedly washing the cells trapped on window 104 with large volumes of water or with a solution of normal saline. An alternative to simply washing away "contaminating material" of no spectral 20 interest or material that might confound the spectra of the cells is to wash the window with chemical mixtures that react with contaminants. For example, again in the case of the desire to remove mucous, the cells trapped on the window can be washed with mucolytic agents to remove this mucous. In this regard, the contact time between wash liquid and cells 25 trapped on window 104 can be controlled by varying the strength of the applied vacuum; this is especially valuable when the body is nonwettable as in the case of polyethylene, polypropylene, or other suitable hydrophobic materials.

According to the present invention, the preparation of the cells trapped on window 104 may be modified for desired purposes. Solutions containing vibrationally useful probes 30 of surface molecules can be reacted with cells trapped on the window and then washed away prior to spectral analysis of the cells. This will provide means for enhancing or

suppressing desired spectral aspects of the cells.

Also according to the present invention, it is possible to remove small cells from large cells on window 104. Samples of cervical cells often contain blood cells, which are quite small as compared with the size of cervical epithelial cells. Proper selection of the 5 pore size in window 104 will allow for the separation of epithelial cells from blood cells. This will enhance the spectral analysis of the small numbers of epithelial cells in the presence of large numbers of contaminating blood cells.

10 The above examples apply to processing cells in relatively small volumes of body fluids, e.g. 1 to 2 ml or less. The present invention applies equally to processing cells in extremely dilute suspension in large volumes of body fluids. This is true even when there are liter amounts of fluids such as urine, ascites, pleural fluid, and cerebrospinal fluid, and the like in which a small number of cells reside. These larger fluid amounts can be easily added directly to window 104 of sample holder 100 without prior treatment of the cells or efforts to concentrate them in any way. The entire volume of fluid up to several liters, and all the cells suspended in a large volume, can be added to window 104 of sample holder 15 100, as will be described.

20 Referring to Figure 7, generally at 260, when large volumes of dilute suspensions of cells are to be processed, the sample holder and vacuum filtration system include detachable funnel 262 that is disposed in groove 106 in the top surface of body 102 of sample holder 100. Funnel 262 has bottom edge 208 that is dimensioned to fit into groove 26 106 in body 102. Spaced up from bottom edge 208 is circular flange 266 which is used for handling funnel 262. Funnel 262 prevents spillage and loss of cells.

25 Figure 8 at 300 shows a second embodiment of the system for adding and concentrating cells on window 304 for vibrational spectroscopic analysis. In Figure 8, window 304 is not attached permanently to body 308 of filter holder 302 but is free and is inserted into filter holder 302. Window 304 is disposed within filter holder 302 and filter holder 302 can be opened after use to remove window 304. Filter holder 302 may be made of any suitable material.

30 Preferably filter holder 302 includes frit 308 and cap 314. The frit and cap are made preferably from molded plastic. Cap 314 has a hollow member that extends upward from the top. Cap 314 and frit 308 sealably and detectably mate. Filter holder 302 holds window 304 in place and prevents it from tearing when positive pressure is applied.

Referring to Figure 8, window 304 is bordered by non-porous frame 312 that is disposed on frit 308. Frame 312 restricts the cells collected on window 304 to small area and facilitates manipulation of window 304 after it is loaded with cells.

Figure 9 shows a top view of frit 308. Frit 308 is disposed below window 304 and 5 has a plurality of openings 310 in fluid connections with the flask 152.

The member that extends upward from the top of cap 314 connects to syringe 320 via Luer lock 322 or any other suitable attachment mechanism. Plunger 324 is disposed in the top end of syringe 320 for forcing fluid with cells down to window 304. More specifically, the cells suspended in fluid medium within the barrel of the syringe 320 are 10 collected on the window by applying positive pressure to plunger 324 of syringe 320 and filtering the suspension through window 304 that is held in filter holder 302. Once this is accomplished, window 304 with attached cells is removed from filter holder 302 by grasping window 304 via non-porous border 312. Filter holder 302 is discarded if it is made of plastic or other inexpensive materials or it can be washed for reuse if it is made of stainless steel or other expensive material.

15 Window 304 with trapped cells is mounted on body 352 of disposable sample holder 350 that is shown in Figures 11A and 11B. Figure 11A shows the top view and Figure 11B shows the bottom view of the sample holder. Other methods for mounting window 304 on body 352 of sample holder 354 can be used. For example, window 304 may be mounted magnetically to a steel sample holder.

20 Window 304 with trapped cells is removed from filter holder 302 and placed in infrared transparent support 380. This transparent support shown in Figure 10, preferably is made from crystalline CaF<sub>2</sub> or other crystalline, infrared-transparent materials. Window 304 and support 380 may be mounted in standard infrared sample holder 354.

25 Referring to Figure 12, an assembly is shown for removing cervical cells from brushes or spatulas. With plunger not removed from barrel 402 of modified syringe 400, the brush or spatula with cells attached is placed in the fluid medium in the barrel. Cap 406 is placed on the top of barrel 402 and the assembly is shaken to dislodge the cells from the collecting devices into the fluid medium. Cap 406 is removed and the collecting devices are removed from barrel 402. Next, the syringe is fitted with plunger 404. Plunger 406 is used to apply positive pressure on the fluid medium containing the cells.

30 A third embodiment of the system for collecting and concentrating cells is shown

in Figure 13. This embodiment has an attached metal channel on cap 314 for puncturing the bottom of syringe 400 (Figure 12). Positive pressure on plunger 404 of the syringe 400 will cause cells in the fluid medium to be applied to window 304. Alternatively, cervical cells in suspension, or any other type of cell in any type of collecting tube, are aspirated into a 5 standard syringe. The standard syringe then is attached to filter holder 302 as in Figure 8, and the cells in suspension are added to the window held within the filter holder.

Any of the manipulations of cells described with respect to embodiment of the invention depicted by Figures 4A, 4B, 5A and 5B can be applied to the embodiments in Figures 8 -13. For example, cells can be fixed after they are trapped on the window within the filter holder by changing syringes and treating the window with appropriate fixative. 10 The filter holder and syringe systems shown in Figures 8-13 can be used with fixed cells. When fixed cells are used, residual fixative is washed from the cells by changing the syringe to appropriate wash solution. Additionally, fixative or other reagents of potential use in the analysis of the cells can be present in the syringes to which cells are added.

15 Referring to Figure 14 at 500, the system and method (automatic and semi-automatic) of the present invention will be described. After vigorous shaking to transfer cells from collecting devices to fluid suspension 552 in the collecting device 502, the system shown generally at 500 is used for manual or automatic collection and concentrating of cells for analysis. First end 509 of tube 506 is disposed in fluid suspension 552 in collecting device 502. Pump 516 causes the fluid medium to flow in direction "A" in tube 20 506. The cells are delivered to window 532 of sample holder 530 from end 507 of tube 506. The vacuum suction in flask 520 draws the fluid associated with the cells through the window and frit into the flask. This action may take place automatically. Preferably, the rate of aspiration for automatic operation substantially matches the rate of filtration, or the former is slower than the latter, to prevent spillage or waste of cells. All or the part cells 25 may be added to window 532 in this way. The amount of cells to be added can be controlled by a device that controls the volume of the aspirate. Even this feature of the device can be controlled automatically, which is especially useful for controlling the amount of cells added to the window.

30 According to Figure 14, there is continuous monitoring through a suitable optical window 512 of the aspirated stream in the flow path between aspirating pipette 506 and window 532 of sample holder 530. Window 512 may be observed visually or via the

5 sensors at 540 and 542. The simplest method, in this regard, and the preferred embodiment of the present invention is to monitor turbidity by light scattering. Other ways to monitor the amount of cellular material in the stream are by absorption of protein or DNA, for example, but light scattering will be intense at short wavelengths. Independent of the optical method used to monitor the amount of cellular material in the stream of flow to window 532 of sample holder 530, a built-in program correlates flow rate for aspiration and the measurement of turbidity (or another optical property) to calculate the volume of suspension that must be added to window 532 to yield a sample with an optimal number of cells on window 532. When this volume of cells is added, aspiration is cut-off.

10 To facilitate a uniform distribution of cells in suspension, after shaking to displace them from the collecting devices, the collecting fluid is maintained at high density by addition of sucrose or other suitable material. Whatever material is used to increase the density of the collecting fluid and thereby to decrease the rate of settling of cells, it must be washed from the window after the requisite number of cells (based on measurements of turbidity) has been added to window 532. In the case that an inadequate number of cells has 15 been added, after aspirating all the suspension, the system can provide a print out, a flashing light, or other suitable alarm (not shown) to show this condition.

20 In a large clinical pathology laboratory, complete automation of sample preparation can be obtained. In such operations, the bottles containing the cells are shaken automatically. Two sample holders, one for the endo- the other for the exocervical samples, are imprinted automatically with the same identifier code. Then the suspensions of endo- and exocervical cells are aspirated and added to the appropriate windows. Control of the number of cells added to each substrate is effected as described above and illustrated in 25 Figure 14. Once the cells are added, routines are carried out for washing cells and/or for treating the cells with fixatives, and for specific chemical treatments for specific modification of the cells, as described.

25 In Figure 4, window 104 of sample holder 100 preferably has a diameter of approximately 3 mm. The beam of light in a standard infrared spectrometer is reduced to as small as 1.3 mm. With microscopic attachments, smaller light beams can be accomplished, down to the limit of diffraction effects. In the mid-infrared, the diffraction limit is greater than the dimensions of a single cell. In the near infrared, however, light 30 beams the size of a cell can be produced, which applies as well to spectroscopy by Raman

scattering.

Generally, spectra collected on cells represent an average spectrum of all cells in a sample. The capacity of vibrational spectroscopy to detect disease in cells and stage the severity of disease can be maximized by examining cells one at a time. To do so, requires that cells be added to a window such that the cells are spread out across the surface of the window. According to the present invention, the application of cells to the window provides a controlled method of adding cells to the window so that vibrational spectra can be collected simultaneously on a minimal number of cells at any one time or even one cell at a time. To do this, the aspirated cells in suspension are added to the window as shown in Figure 14.

The drop-wise addition is controlled, as regards the size of the drops (which depend in part on the concentration of cells in the suspension) and their location on the window, by computer software that drives the tip of the pipette in small increments (as small as 1  $\mu\text{m}$ , for example) across the horizontal and vertical dimensions of the window. Since the amount of fluid added at any one time is small and not allowed to spread across the window, the cells become "stuck" where they are deposited. The coordinates of the window at which cells are deposited are then used as a basis for washing the cells, again in drop-wise fashion or for treating cells as discussed above. Finally, the coordinates of location of cells on the window are fed on-line to the spectrometer, which has microscopic optics. The spectrometer collects and co-adds interferograms from each coordinate moving across and sampling multiple regions of the surface of the window. Software may direct the collection in this way on the basis of the stored coordinates for the positions of cells on the window. Each co-added spectrum is analyzed separately and simultaneously with the scanning of the window until the entire window has been scanned - cell by cell in some cases - or until a definitive diagnosis of disease can be made.

The terms and expressions which are used herein are used as terms of expression and not of limitation. There is no intention in the use of such terms and expressions of excluding the equivalents of the features shown and described, or portions thereof, it being recognized that various modifications are possible in the scope of the present invention.

## Claims:

1. A sample holder for collecting and concentrating cells for use in vibrational spectroscopy, comprising:
  - 5 a central body having a predetermined shape and being transparent to infrared and Raman energy;
  - a stepped opening through the body;
  - a window disposed in the stepped opening, with the window being transparent to infrared and Raman energy and including pores of predetermined size extending through the window.
- 10 2. A system for collecting cells on a window of a sample holder that is used in vibrational spectroscopy:
  - a container having a first outlet for connection to a vacuum source, a second outlet for connection to a drain means, and a top end; and
  - 15 an interface member that sealingly connects to the top end of the container and has a surface adapted to mate with the sample holder, with the interface member being in fluid communications with both the window of the sample holder and the container.
- 15 3. A system for collecting cells for use in vibratory spectroscopy, comprising:
  - a sample holder for collecting and concentrating cells, with the sample holder further including,
    - 20 a central body having a predetermined shape and being transparent to infrared and Raman energy;
    - a stepped opening through the body;
    - a window disposed in the stepped opening, with the window being transparent to infrared and Raman energy and including pores of predetermined size extending through the window; and
    - 25 an assembly for causing cells to be collected and concentrated on the window of the sample holder, with the assembly including,
      - a container having a first outlet for connection to a vacuum source, a second outlet for connection to a drain means, and a top end; and
      - 30 an interface member that sealingly connects to the top end of the container

20

and has a surface adapted to mate with the sample holder, with the interface member being in fluid communications with both the window of the sample holder and the container.

5

10

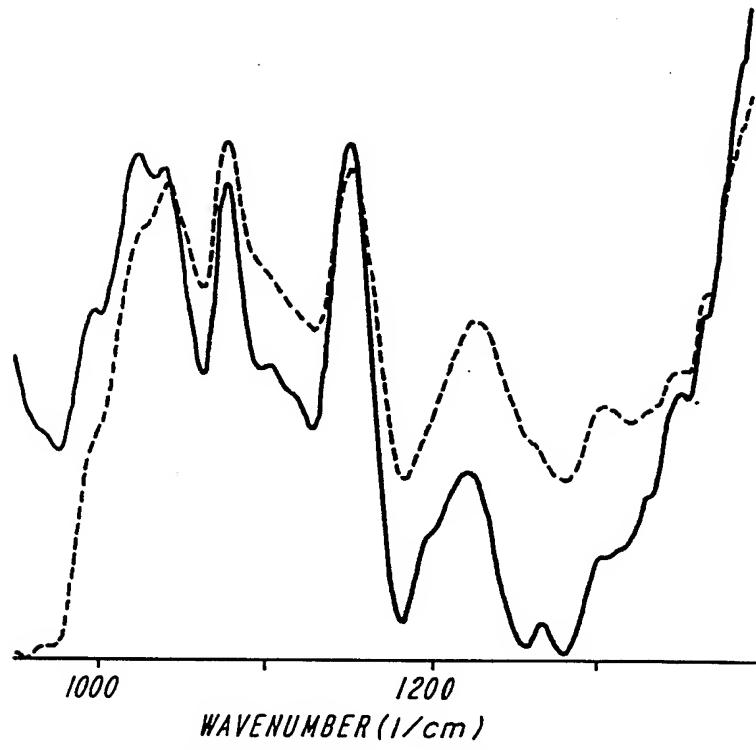
15

20

25

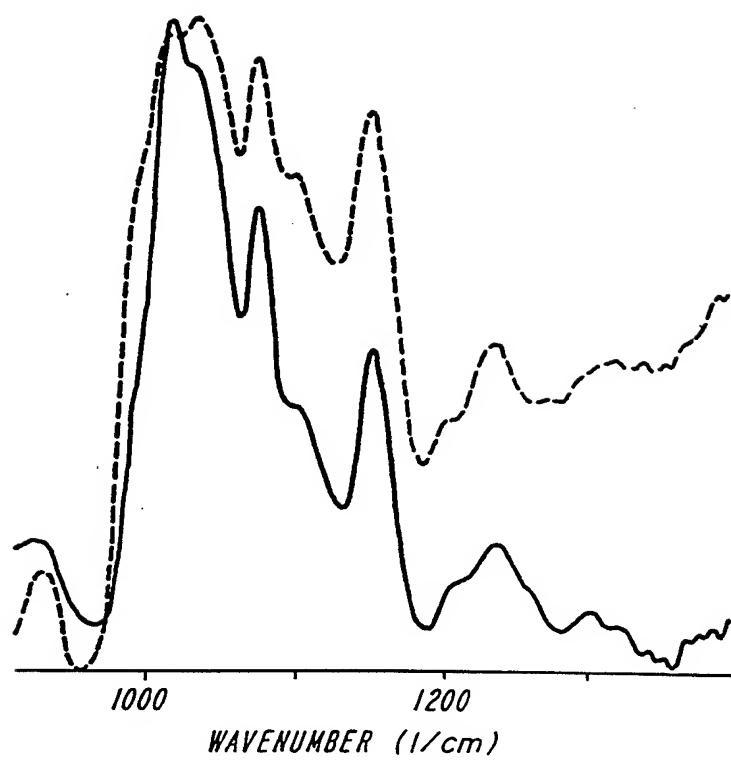
30

1/6

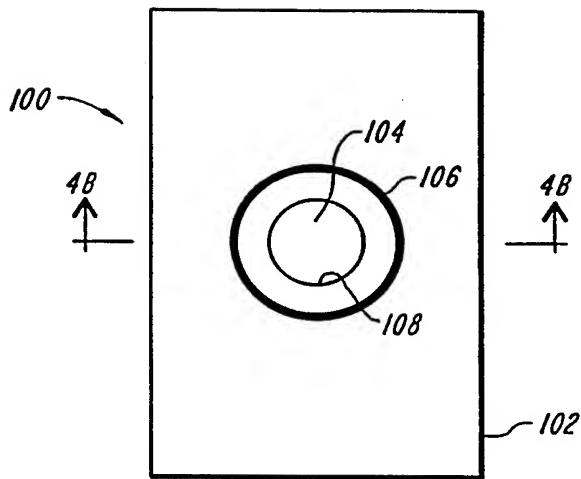
**FIG. 1****FIG. 2**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

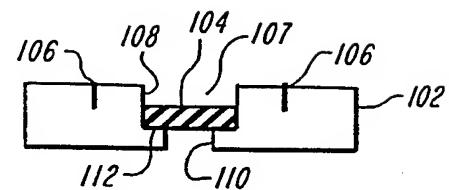
2/6



*FIG. 3*



*FIG. 4A*



*FIG. 4B*

3/6

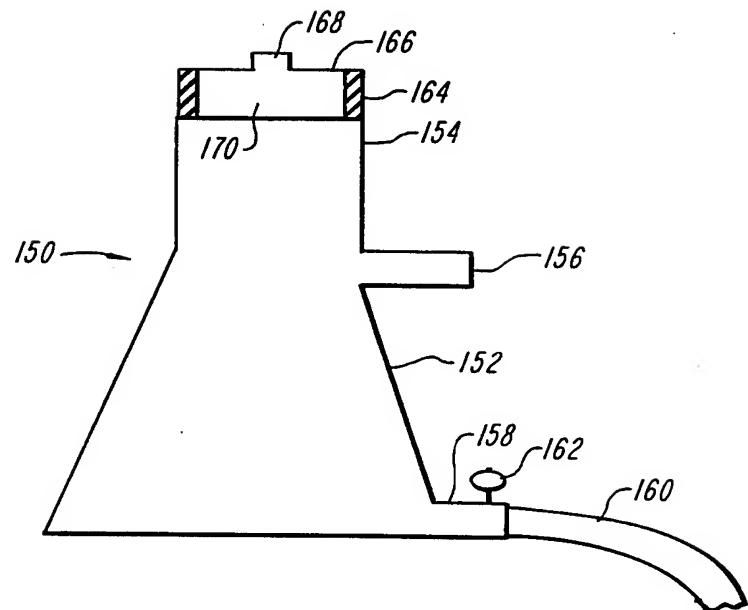


FIG. 5A

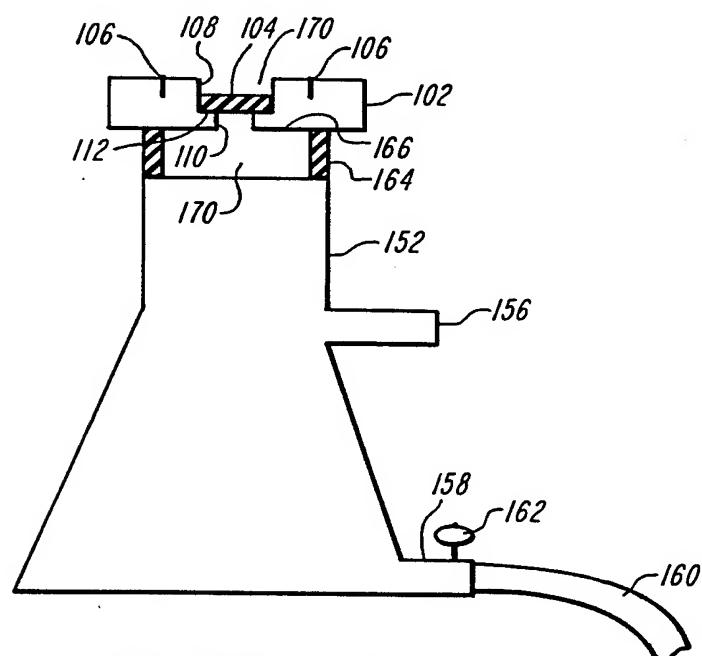
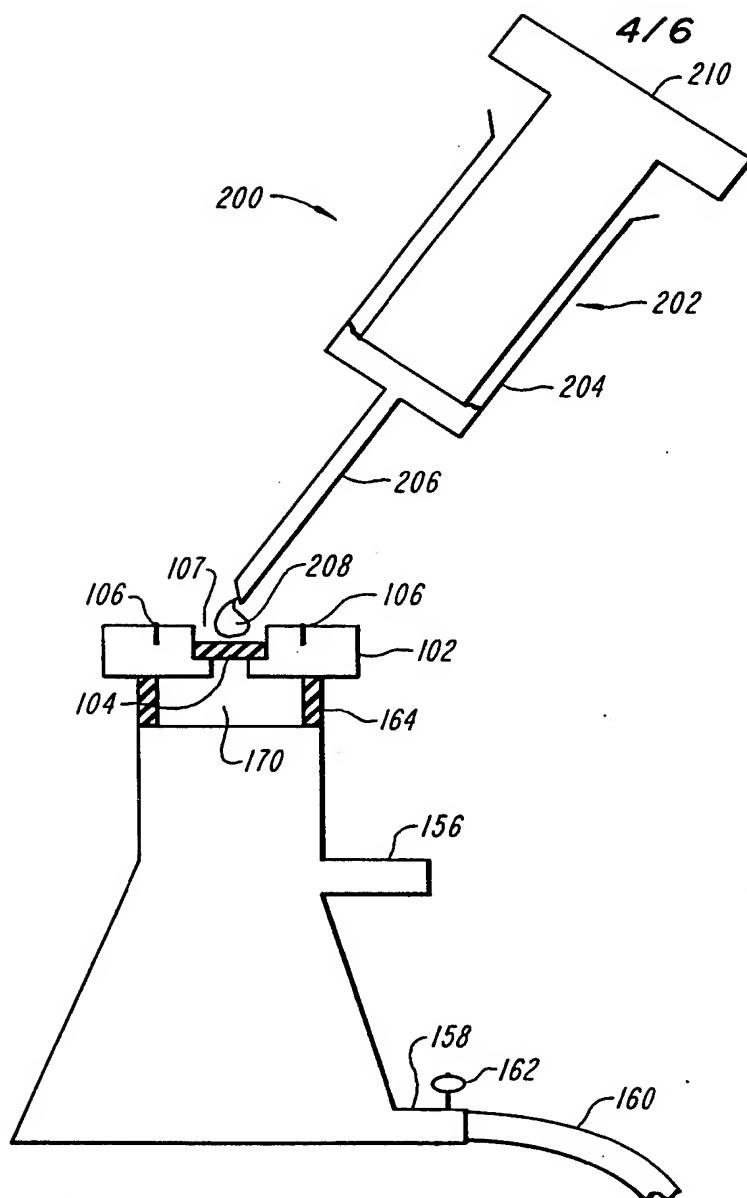
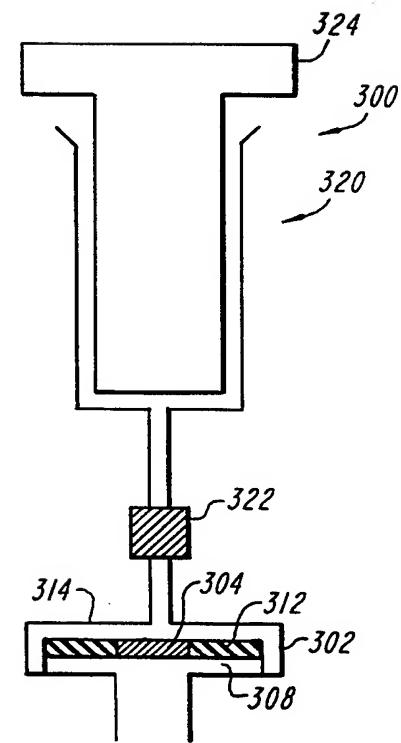


FIG. 5B



**FIG. 6**



**FIG. 8**

5/6

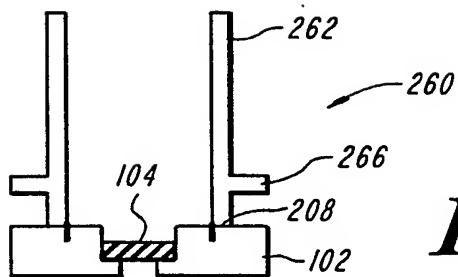


FIG. 7

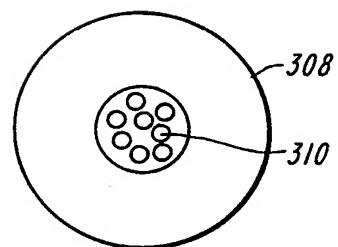


FIG. 9

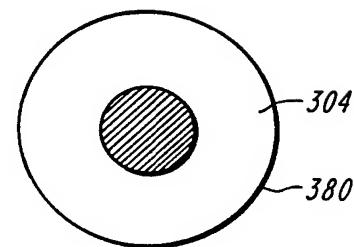


FIG. 10

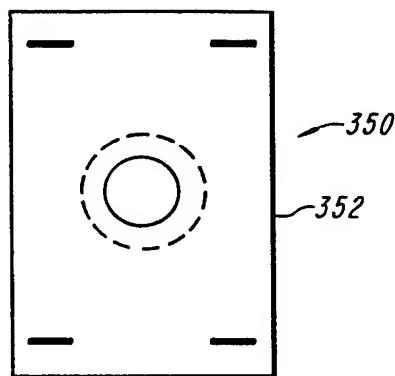


FIG. 11A

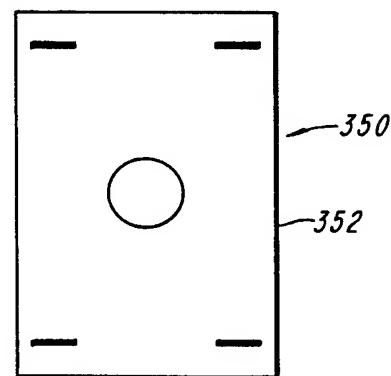


FIG. 11B

6/6

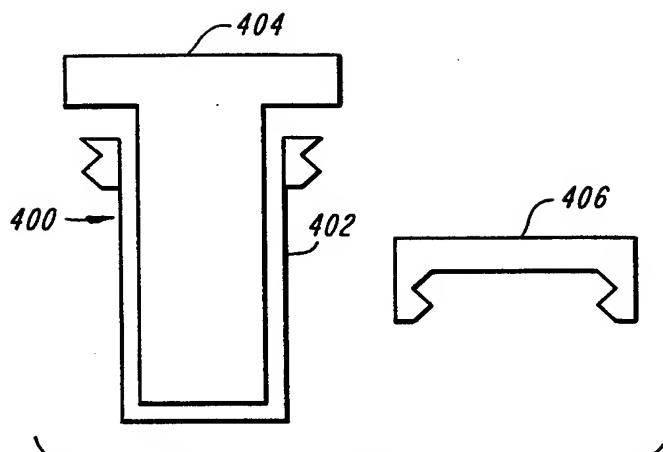


FIG. 12

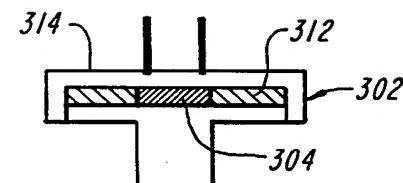


FIG. 13

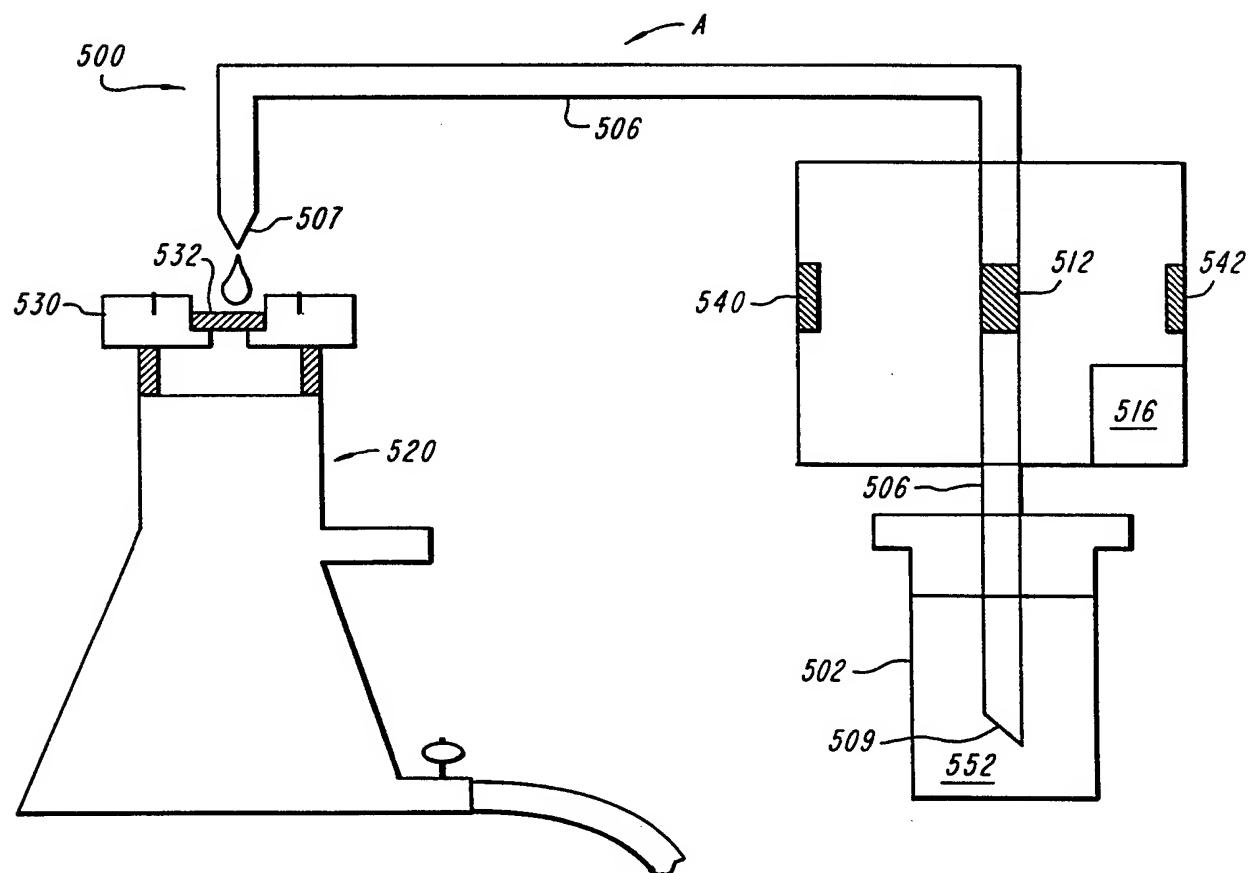


FIG. 14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No PCT/US 96/09304	
---	--

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 G01N21/35

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,5 408 306 (ANDERSON) 18 April 1995 see abstract	1,3
X	see column 4, line 49 - line 60 see column 5, line 30 - line 40 see column 5, line 45 - line 51 see figures 3,4	2
Y	US,A,3 521 963 (BADER) 28 July 1970 see column 4, line 41 - line 48 see column 4, line 55 - line 61 see figures	1,3
A	WO,A,90 15981 (UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 27 December 1990 see page 1, line 7 - line 18 see page 7, line 22 - line 26 see page 8, line 9 - line 13 see figures 9,10; examples 6,7	1-3
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 1996

Date of mailing of the international search report

09.10.96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 96/09304

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 00580 (MINNESOTA MINING) 7 January 1993 see abstract see page 20, line 34 - page 21, line 21; claim 30 -----	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 96/09304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
US-A-5408306	18-04-95	NONE			
US-A-3521963	28-07-70	NONE			
WO-A-9015981	27-12-90	DE-D- DE-T- EP-A- JP-T-	69004430 69004430 0478596 4506402	09-12-93 17-03-94 08-04-92 05-11-92	
WO-A-9300580	07-01-93	AU-A- CA-A- EP-A- JP-T- US-A-	2304592 2103446 0591417 7500180 5470757	25-01-93 26-12-92 13-04-94 05-01-95 28-11-95	

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-507724

(43)公表日 平成11年(1999)7月6日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 21/01  
C 1 2 M 1/42  
G 0 1 N 21/03  
21/35  
21/65

識別記号

F I  
G 0 1 N 21/01  
C 1 2 M 1/42  
G 0 1 N 21/03  
21/35  
21/65

B  
Z  
Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-501656  
(86) (22)出願日 平成8年(1996)6月6日  
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)12月8日  
(86)国際出願番号 PCT/US96/09304  
(87)国際公開番号 WO96/41153  
(87)国際公開日 平成8年(1996)12月19日  
(31)優先権主張番号 08/485,366  
(32)優先日 1995年6月7日  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インフォサイト・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10601, ホ  
ワイト・プレインズ, メイン・ストリート  
350  
(72)発明者 ザキム, デヴィッド・エス  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10504, ア  
ーモンク, コール・ドライブ 15  
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】赤外線及び/又はラマン分光分析に使用される生物細胞標本ホルダ

(57)【要約】

赤外線分光分析及び/又はラマン分光分析に使用される生物細胞標本ホルダが提供される。標本ホルダは、矩形のボディを備えており、このボディは、該ボディの中心を貫通する段付きの開口を有している。ボディは、赤外線エネルギー及びラマンエネルギーに対して透過性を有している。段付きの開口の中には、窓が設けられている。この窓は、液体は通過させるが関心のある細胞は窓の上に留める所定サイズの気孔を有している。細胞を窓の上に採取して濃縮するために使用されるアセンブリも備えている。このアセンブリは、フラスコを備えており、このフラスコは、真空源に接続される第1の出口と、ドレン装置に接続される第2の出口とを有している。フラスコは、開口した頂端部を有している。フリットが、フラスコの頂端部に封止的に結合する。フリットは、中空であり、該フリットの頂面から伸長するニップルを有している。フリットは、標本ホルダに嵌合するようになった頂面を有している。

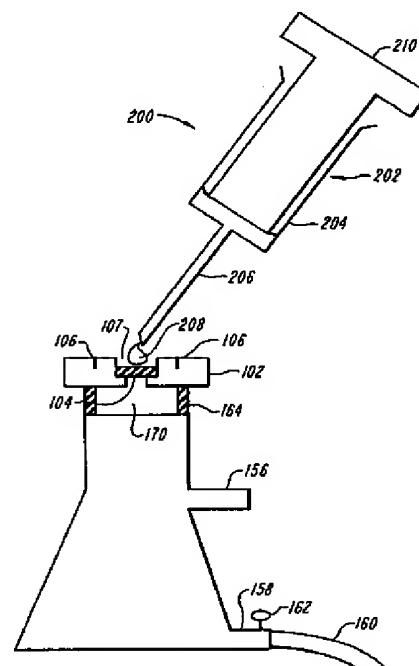


FIG. 6

**【特許請求の範囲】**

1. 細胞を採取して濃縮するための振動スペクトル分光分析に使用される標本ホルダであって、

所定の形状を有すると共に、赤外線エネルギー及びラマンエネルギーに対して透過性を有する、中央のボディと、

該ボディを貫通する段付きの開口と、

該段付きの開口の中の設けられる窓とを備えており、

前記窓は、赤外線エネルギー及びラマンエネルギーに対して透過性を有すると共に、該窓を貫通する所定サイズの気孔を有するように構成されたことを特徴とする標本ホルダ。

2. 振動スペクトル分光分析に使用される標本ホルダの窓の上に細胞を採取するための装置であって、

真空源に接続される第1の出口、ドレン手段に接続される第2の出口、及び、頂端部を有している、容器と、

該容器の前記頂端部に封止的に接続されると共に、前記標本ホルダに嵌合されるようになった表面を有する、インターフェース部材とを備えており、

該インターフェース部材は、前記標本ホルダの前記窓、及び、前記容器の両方に流体連通するように構成されたことを特徴とする装置。

3. 振動スペクトル分光分析に使用される細胞を採取するための装置であつて、

細胞を採取して濃縮するための標本ホルダを備えており、

該標本ホルダは、更に、

所定の形状を有すると共に、赤外線エネルギー及びラマンエネルギーに対して透過性を有する、中央のボディと、

該ボディを貫通する段付きの開口と、

該段付きの開口の中の設けられる窓とを備えており、

前記窓は、赤外線エネルギー及びラマンエネルギーに対して透過性を有すると共に、該窓を貫通する所定サイズの気孔を有するように構成されており、

当該装置は、更に、

細胞を前記標本ホルダの窓の上に採取して濃縮させるためのアセンブリを備えており、

該アセンブリは、

真空源に接続される第1の出口、ドレン手段に接続される第2の出口、及び、頂端部を有する、容器と、

該容器の前記頂端部に封止的に接続されると共に、前記標本ホルダに嵌合するようになった表面を有する、インターフェース部材とを備えており、

該インターフェース部材は、前記標本ホルダの窓、及び、前記容器の両方に流体連通するように構成されたことを特徴とする装置。

## 【発明の詳細な説明】

赤外線及び／又はラマン分光分析に使用される生物細胞標本ホルダ

### 発明の分野

本発明は、赤外線分光分析及び／又はラマン分光分析によって分析すべき生物細胞を保持するために使用される標本ホルダに関する。

### 発明の背景

診断病理学と呼ばれる細胞及び組織の観察は、依然として、医学的な診断を達成して患者に最も適した治療を選択するための重要な工程である。病理学の実施は、多くの場合において、診断を確定することに限定されており、その理由は、病気の臨床的な特徴に關係する個々の細胞の形態学的な変化を認識することが困難であるからである。これは、細胞は観察できるが、組織の無傷のブロックを観察することができない場合に、特に重要な問題である。

病理学的な及び臨床的な診断を確定するための基準となる細胞の顕微鏡観察の精度及び臨床的な価値は、益々重要になってきており、組織を必要とすることなく、前癌及び癌の段階を特定する方法を提供する。この方法は、また、通常は外科的な処置によって入手される組織を得るよりも、容易、安全且つ廉価に細胞を得ることができるので、魅力的である。

組織に比較してより容易に細胞にアクセスできるので、そのような細胞を用いて、癌の如き病気の早期の段階の証拠となる健康な個体群のスクリーニングを行うことができる。例えば、子宮頸細胞を観察して、子宮頸の前癌及び／又は癌の早期段階を検知したり、尿の中の細胞を観察して、泌尿器癌の早期段階を検知したり、あるいは、痰の中の細胞を観察して、肺癌の早期の診断を行う。これらの種類の「細胞学的」な検査は、診療及び公衆衛生にとって益々重要になってきている。そのような検査は、細胞学的な観察の臨床的な価値が限定されており、誤った否定的な結果の割合が高いので疑わしいものもあるにも拘わらず、重要である。細胞学的な検査は、また、誤った肯定的な結果の割合が高いという問題も抱えている。そのような結果は共に、患者の信頼に否定的な衝撃を与え、健康管理

のコストを必要に高くする。

癌の発生率は、他の病気の発生率が低下し、人間の寿命が長くなるに連れて、高くなっている。また、癌は、この後数年にわたって健康上の主要な問題であり続けるであろう。癌の問題の負担を処理する最善のアプローチは、前癌段階において病気を発見して、前癌細胞からの明白な癌の出現を阻止することである。この目的を達成する方法は、病気の前癌段階の細胞を検知して、前癌の病気が明白な癌に移行している範囲を示すより良い方法である。

染色された細胞を顕微鏡観察して前癌及び早期段階の癌を検知する伝統的な方法に代わる方法は、細胞の中の分子の化学的及び物理的な性質を評価することである。このアプローチの理屈は、細胞の中の分子の化学的及び物理的な性質の正常性又は異常性が、健康又は病気の基準であるということである。細胞の中の分子の化学的及び物理的な性質の変化は、病理学が病気の証拠として顕微鏡的に検査する形態学における変化に先行し、その基礎となる。

全部の細胞の振動スペクトル分光分析（例えば、赤外線分光分析及びラマン分光分析）は、細胞の中の分子が正常であるか異常であるかを測定するための敏感な方法であることが知られている。また、細胞の振動スペクトルの異常性が、組織及び細胞の顕微鏡観察によって行われる病理学的な診断に関係することも知られている。本件出願と同時に係属している米国特許出願（発明の名称：“A System and Method for Diagnosis of Disease by Infrared Analysis of Human Tissue and Cells”、出願日：1995年6月7日）は、細胞の赤外線分光分析は、細胞の顕微鏡観察によっては検知することのできない病気を検知し、最終的には癌になる前癌の変化の連続体による正常細胞の進展を検知し、遺伝子及び表現形の異常性の集積における種々の細かい経路によって進行する異数体の段階によって細胞の進展を検知し、細胞のウィルス感染の存在を検知することを開示している。

細胞の研究を行うための分光分析の使用、すなわち、種々の振動数を有する光線が細胞の中の分子とどのような相互関係を有するかを詳細に説明することは、医療技術として初期の段階にある。しかしながら、振動スペクトル分光分析によって観察するために細胞を準備するための迅速で廉価な方法が必要とされている

。

病理学的な観察を行うために顕微鏡観察の前に細胞を準備する（例えば、細胞の定着、埋め込み、及び、染色を行う）通常の方法は、分光分析の観察を行うために細胞を準備するためには、特に有用ではない。また、無生物を研究するために分光分析を行う人が使用する方法は、医療診断を行うための振動スペクトル分光分析観察のための細胞を準備するためには、有用ではない。その理由は、そのような方法は時間がかかり、骨が折れ、また、高価であるからである。また、細胞を研究するために分光分析を行う人が使用している方法は、オペレータ側に高度な注意力及び専門技術を必要とし、これが、振動スペクトル分光分析の方法を病気の診断に一般的に応用することを更に困難にしている。

基本的には、振動スペクトル分光分析によって観察するために細胞を準備するためには、3つの周知の方法がある。第1の方法は、そのような準備を全く行わない方法である。この方法は、細胞をその自然の状態で適宜な標本ホルダに付加し、少量の水の存在下で分析することを必要とする。第2の方法は、細胞を標本ホルダの上に置き、乾燥によって総ての水を除去する方法である。第3の方法は、細胞を分離し、乾燥させ、KBrディスクに組み込む方法である。更に、細胞遠心分離によって細胞を(BaF<sub>2</sub>の)赤外線窓に直接付加する方法も用いられている。

上述の方法は総て、経費及び時間がかかり、また、この方法を実行できる適正な人員の確保が限定されるというような重要な問題を有している。しかしながら、組織から採集された細胞、患者から採集された細胞、患者の体液から採集された細胞、培地から採集された細胞、あるいは、他の方法で採集された細胞は総て、上述の標本準備方法に直接使用することはできない。

上述の問題を明瞭にするために、本明細書は、例えば、赤外線分光分析による子宮頸細胞を観察する問題を考える。細胞は、ブラシ又はスパチュラ（へら）で搔き取ることによって、子宮頸から採集される。通常の細胞学に関しては、そのような細胞は、ブラシ又はスパチュラからガラススライドの上に直接塗りつけられる。この方法は、振動スペクトル分光分析のための準備方法として用いること

はできず、その理由は、分光計の光ビームが、代表的なスミアの領域をカバーできないからである。また、スライドの上に堆積された細胞及び粘液の厚さを調節

することが困難である。更に、細胞のスペクトル分析を阻害しないように完全に洗浄除去できる物質で細胞を定着する際には、何等かの問題が存在する。最後に、中赤外線の光線に対して透過性を有するスライド材料に使用される物質は、比較的高価である。

塗りつけるのではなく、採集ブラシ及びスパチュラを液体媒体の中で強烈に振とうさせることによって、細胞を上記ブラシ及びスパチュラから取り除くことができる。次に、上記液体媒体の中の細胞を濃縮し、その後観察を行う。この濃縮は、スペクトルを得る正確な諸条件とは無関係である。もし濃縮された細胞が乾燥せることなく直接観察されるなら、細胞に対する水の量は、極めて少量でなければならず、さもなければ、そのような水は、赤外線を強く吸収するので、結果に悪影響を与えることになる。

上述のように、乾燥によって細胞を準備して、そのような乾燥された細胞を観察することができる。乾燥した細胞の観察は、細胞を最終的に濃縮することなく、振動スペクトル分光分析に使用することはできない。濃縮することが必要な理由は、一時にほんの少量（マイクロリットルの範囲）の細胞サスペンションを、振動スペクトル分光分析のための適宜な標本ホルダに付加することができるからである。適正な数の細胞を適宜な赤外線標本ホルダに付加することは、例えば、サスペンションの状態の細胞を数マイクロリットルの液滴として連続的に付加し、標本の各アリコット（液滴）を、次のアリコットを付加する前に、標本ホルダ上で乾燥せることに依存する。これは、非常に時間のかかるプロセスであって、臨床的な用途には適していない。すなわち、そのようなプロセスは、少量（約20マイクロリットル）の標本に関して、20乃至30分間程度を要する。

乾燥された細胞を用いた場合でも、細胞が定着されていなければ、アーチファクト（artifact）が生ずる。この意味において、細胞の定着は、かなり煩雑で、労力及びコストを増大させ、技術及び繊細さを必要とする。また、使用する定着剤は、細胞からスペクトルを収集する前に、かなりの洗浄を行って細胞から除去

しなければならない。この工程又は一連の工程は、振動スペクトル分光分析に使用可能な現在入手可能な標本ホルダの範囲内では、実行することができない。

濃縮及び乾燥を行う標本準備方法は、細胞を KBr ディスクに組み込む工程を

含む。この方法は、細胞を事前に濃縮してその後乾燥を行うことに依存する。この方法を用いると、濃縮された細胞を標本ホルダに直接付加することに比較して、何等利点を得ることができない。

細胞の濃縮は、細胞を懸濁液体から分離する遠心分離によって、行うことができる。細胞の濃縮を遠心分離によって行うことは困難ではないが、特殊な機器、時間、及び、労力を必要とする。また、遠心分離によって細胞を濃縮することを必要とするので、細胞を適宜な標本ホルダに付加するプロセスを自動化することが困難である。例えば、何等かのタイプの水溶液媒体の中に懸濁された子宮頸細胞、あるいは、体液の中に懸濁された細胞の場合には、細胞のサスペンションを遠心分離し、上澄を吸引及びデカンテーションによって除去する。子宮頸細胞の場合には、細胞は、比較的少量の液体の中に懸濁しており、そのような液体は、小型の遠心分離機によって容易に除去することができる。しかしながら、細胞が体液から採取される場合には、液体の量は、かなりの体積（例えば、1リットル又はそれ以上）であって、遠心分離による濃縮プロセスを複雑にする。

細胞が、遠心管の底部にペレットとして濃縮された後に、濃縮された細胞の少量のアリコットが、種々の適宜な標本ホルダの上に直接滴下される。そのような細胞は、湿った状態で観察することができ、あるいは、上記細胞は、観察を行う前に、標本ホルダ上で乾燥させることができる。湿った状態の細胞の観察は、そのような湿った標本を閉鎖系に閉じ込めるために、標本ホルダの第2の窓を必要とし、これにより、そのような標本ホルダを洗浄する際のコスト及び労力を増大させる。

乾燥状態における細胞の観察の複雑性は、上述のように、標本ホルダ上の20乃至40マイクロリットルの標本を室温で乾燥させるためには、20乃至30分間を要するということである。この時間の間に、定着されていない細胞は、その成分を自己消化し、これにより、そのような細胞から収集されるスペクトルにア

ーチファクトを生じさせる。

定着されていない細胞を室温で放置することにより生ずる問題は、それが比較的短い時間であっても、図1に示すスペクトルによって示される。実線で示すスペクトルは、同じ標本ホルダの上の未定着細胞の同じ標本に関して破線で示すスペクトルを収集する前に、10分間で収集された子宮頸細胞の赤外線スペクトルである。1023cm<sup>-1</sup>の領域におけるスペクトルが、未定着細胞の代謝作用によってどのように変化するかに注意する必要がある。

図2は、数時間の間に得た未定着子宮頸細胞の2つのスペクトルを互いに比較している。この場合には、未定着細胞のスペクトルには、時間経過と共に大きな変動が見られる。

図3は、未定着（破線）及び定着された（実線）子宮頸細胞のスペクトルを比較している。未定着標本と定着標本との間の時間差は、30分間であった。この時間差は、通常の赤外線標本ホルダの窓に細胞を付加し、これら細胞を20°Cで乾燥させるに必要な時間である。図3は、細胞を定着させることにより、未定着子宮頸細胞のスペクトルの特徴に代謝により生ずる短期的な変化が防止される様子を示している。これらの例は、定着により細胞の代謝機能が阻止されるので、定着細胞に対して細胞のスペクトル観察が最も良好に行われることを明白にしている。その外には、細胞が標本ホルダに付加された後のスペクトルの特徴に対する細胞の生命力の効果を調節する方法は存在しない。上述の例は、また、事前定着を行わなければ、加熱乾燥が効果的ではないことを示しており、その理由は、そのような加熱は、未定着細胞の自己消化速度を上昇させるからである。

上述の事柄は、従来は、ヒトの細胞、又は、他の任意の発生源からの細胞が、標本を時間をかけて一時に個々に準備することに基づいて、赤外線分光分析により観察されていることの証拠を示している。そのような従来の方法は、サスペンションから適宜な標本ホルダへ細胞を移動させるために複数の工程を必要とするばかりではなく、細胞を定着させなければ、分析スペクトルにアーチファクトを導入する結果をもたらす。上述の方法は、高価で、時間がかかり、骨が折れ、自動化に適さず、また、遠心分離装置を必要とすると共に、オペレータの技術及び

注意力に依存する。そのような方法は、また、オペレータの最小の技術及び注意力によって、低コストで多数の標本を迅速に準備することができない。

子宮頸癌を検知する通常の方法は、米国においては、毎年、60,000,000乃至80,000,000個の観察を行っている。上述の制約が、通常の観察に代わり得る振動スペクトル分光分析技術を完全に実施することを阻止している。

る。特に、標本ホルダの制約、標本ホルダへの細胞の装填、及び、そのような細胞の定着が、解決すべき優先的な問題として残っている。

標準的な細胞学又は振動スペクトル分光分析による子宮頸細胞の観察における別のしかし関連する困難性は、子宮頸は、完全に均質な器官ではないということである。例えば、細胞の標本を子宮頸内及び子宮頸外から採取して別個に観察すべきことが認識され且つ勧告されている。この勧告は、検査を実施する経済性の理由から、殆ど守られていない。一人の患者当たりの上記2つの細胞標本は、2つの別個の観察を必要とし、検査を実施する実際のコストを倍加する。従って、早期段階の子宮頸癌、あるいは、子宮頸の前癌を検知する方法は、子宮頸内細胞及び子宮頸外細胞を含む可能性のある一つの標本だけを採取することによって、妥協的に行われている。

振動スペクトル分光分析の方法は、細胞の病気を検知する方法として細胞学的に本質的に優れているだけではなく、標準的な細胞学的な方法に比較して、子宮頸細胞又は他のタイプの細胞を本質的に廉価に観察できる。しかしながら、通常の方法により標本を準備することの困難性が、赤外線分光分析を用いて細胞から収集することのできる総ての情報を妥協させている。そのような標本を準備するためのより良い方法が存在しない状況において、スペクトル分析観察を行うための標本を準備する経済性が、一回の観察当たりに一人の子宮頸細胞の一つの標本だけを採取させ、子宮頸内及び子宮頸外の領域からの標本を、標本を準備する前に混合させ、その混合された振動スペクトルを観察させている。また、分光分析観察用の標本を準備する方法は、スペクトルデータの収集に大きな影響を与えると共に、患者の細胞を適正にサンプリングすることにより得られる臨床的に有用な情報の量に影響を与えることになる。

従って、患者から採取する時点で細胞を処理して振動スペクトル分光分析により実際に分析できるようにするより良い方法が必要とされている。

### 発明の概要

本発明は、赤外線分光分析及び／又はラマン分光分析に使用される生物細胞の標本ホルダである。本発明は、細胞のサスペンション及び液体媒体中の他の成分を、多孔性で細胞を選択的に捕捉することのできる赤外線標本ホルダの窓に附加

することを可能にする。本発明の標本ホルダによれば、細胞は、窓の表面に捕捉され、一方、他の成分は、窓によって濾過される。これにより、細胞を窓の上に配置するのとは別の何等かの方法によって細胞を濃縮する必要がなくなる。同時に、細胞を多孔性の窓の上に捕捉することにより、細胞を大幅に洗浄し、細胞を種々の方法で化学的に処理し、その後、振動スペクトルを変える恐れのある汚染物を洗浄除去することが可能となる。これは、採取媒体に添加される可能性のある汚染物を除去する機能を含み、これにより、細胞の準備を容易にする。

本発明は、医師が患者から細胞を採取する方法を変更させるものではない。例えば、子宮頸に関しては、医師は、現在のPap試験の方法によって、細い針による固定組織の吸引によって、細胞を採取することができ、あるいは、他の領域すなわち部位に関しては、痰、尿、脳脊椎液、腹水、胸膜液、あるいは、他の体液から細胞を採取することができる。更に、本発明は、液体媒体の中に存在する又は存在させるようにすることのできる任意の形態の細胞の採取に応用することができる。

本発明は、細胞の振動スペクトル分光分析を行う目的で細胞を分析光ビームの中に保持する適宜な標本ホルダに採取した細胞を付加するための新規な方法を提供する。振動スペクトルは、任意の赤外線領域において可能であり、赤外線分光分析、あるいは、ラマン共鳴分光分析又はラマン分光分析によって得ることができる。本発明は、また、透過型の分光計又は反射型の分光計によってスペクトルを収集する技術にも応用することができる。

本発明は、窓領域を有する標本ホルダを含む。分析すべき細胞を上記窓領域の上に載せた後に、分析光ビームを細胞及び窓領域に照射する。この分析光ビーム

は、干渉することなく、窓物質を通過する必要がある。上記窓領域は、実行すべき分析に関して関心のある振動数の光線に対して透過性を有しており、標本ホルダの成分とは反応しない。

本発明においては、上述の光学的な要件に加えて、上記窓領域が、該窓の上に置かれた関心のある物質を濃縮する手段を提供する目的を果たし、また、種々の広い範囲の態様で、上記窓の上の標本を処理する手段も提供し、そのような手段は総て、細胞から収集することのできるスペクトル情報の量を高める。

#### 図面の簡単な説明

図1は、定着されていない細胞に関するスペクトル波形の第1の比較を示している。

図2は、定着されていない細胞に関するスペクトル波形の第2の比較を示している。

図3は、定着された細胞及び定着されていない細胞に関するスペクトル波形の比較を示している。

図4 Aは、本発明の標本ホルダの平面図を示している。

図4 Bは、図4 Aの線4 B-4 Bで取った本発明の標本ホルダの断面図を示している。

図5 Aは、本発明の真空濾過装置を示している。

図5 Bは、本発明の標本ホルダが装着されている図5 Aの真空濾過装置を示している。

図6は、採集された細胞を含むシリンジの中の液体サスペンションが本発明の標本ホルダに加えられている状態を示している。

図7は、着脱自在な漏斗が接続されている本発明の標本ホルダを示している。

図8は、細胞を採集し濃縮するための本発明の装置の第2の実施例を示している。

図9は、図8に示す第2の実施例の装置のフリットの平面図を示している。

図10は、窓及び非多孔性の搬送サポートの平面図である。

図11 Aは、本発明の標本ホルダの第2の実施例の平面図を示している。

図11Bは、本発明の標本ホルダの第2の実施例の底面図を示している。

図12は、採集装置から細胞を取り除くためのアセンブリを示している。

図13は、細胞を採集して濃縮するための本発明の装置の第3の実施例を示している。

図14は、自動的に又は半自動的に細胞を採集して濃縮するための装置及び方法を示している。

### 発明の説明

本発明は、赤外線分光分析及び／又はラマン分光分析に使用される生物細胞標

本ホルダである。本発明は、主として、振動スペクトル分光法によって分析される子宮頸細胞を処理するという状況において説明される。しかしながら、本発明は、任意のタイプの細胞又は細胞源に適用可能であるということを理解する必要がある。例えば、血液を含む任意の体液の細胞を子宮頸細胞と同じ態様で処理することができる。また、培地中の細胞の如き実験系の中の細胞は、ヒトの細胞、動物の細胞、植物の細胞、正常細胞、及び、病変細胞を問わず、本発明によって処理することができる。

本発明の標本ホルダの平面図が図4Aに示されている。図4Bは、図4Aの線4B-4Bに沿って取った本発明の標本ホルダの断面図である。これら図面を参照すると、標本ホルダ100のボディ102は標本を載置することができる構造体の役割を果たす。ボディ102は、中央に位置する段付きの開口107を有している。この段付きの開口107は、上方部分108及び下方部分110を有している。環状の棚部112が、上記2つの部分の間に形成されている。窓104が、上記開口の中に設けられていて、環状の棚部112によって支持されている。

分析すべき標本が、窓104の上に載置されている。分析光線が、窓の上の細胞を照射して、スペクトル情報を収集する。標本ホルダ100の窓104は、所定の振動数の光線に対して透過性を有している。また、上記窓は、多孔性であり、従って、水、及び、水に溶解した物質が上記窓を通過することができる。しかしながら、気孔は、細胞を通過させる程には大きくない。実際に、上記窓の気孔

は、窓104を破壊したりあるいは窓を標本ホルダ100のボディ102から引きちぎったりしない圧力において、流体が窓を通過することを許容する。

ボディ102は、また、段付きの開口107と同心円状に配置された溝106も備えている。この溝106は、後に説明するように、大量の液体物質から細胞を採取するために使用される漏斗(図示せず)を取り付けるためのものである。しかしながら、溝106は、本発明を実施するために必要なものではない。

図5Aを参照すると、本発明の真空濾過装置の全体が、参考符号150で示されている。真空濾過装置150は、サスペンション中の細胞を窓104の上に装填するために使用される。真空濾過装置150は、真空フラスコ152と、該真

空フラスコ152の頂部の開口154の中に設けられているフリット164とを備えている。

真空フラスコ152は、真空ポンプ(図示せず)に接続された真空出口156を有しており、上記真空ポンプは、真空フラスコ152を所定の真空度まで真空引きする。真空フラスコ152は、ドレン管路160に接続されているドレン出口158も備えている。弁162が、ドレン管路160に設けられていて、真空フラスコ152からの液体の排出を制御している。

フリット164は、真空フラスコ152の頂部開口154に封止的に嵌合することができる外側の輪郭及び形状を有している。フリット164は、頂面166と、底部の開口170とを有している。中空のニップル168が、頂面166から上方に伸長している。この中空のニップルは、上記開口170に流体連通している。フリット164は、焼結ガラスから形成されるのが好ましい。

図5Bを参照すると、真空濾過装置150は、標本ホルダ100が装着された状態で示されている。図示のように、中空のニップル168は、標本ホルダ100のボディ102の段付きの開口107の下方部分110に嵌合してその頂部が窓104の底部に接するような、寸法形状を有している。

図5A及び図5Bは、頂面166から伸長する中空のニップル168を有するフリット164を示しているが、本発明は、他の形態のフリット164も意図しており、例えば、窓104の寸法を収容する開口を有していて、上記窓がボディ

102の底部と同一平面に位置するように構成された平坦なフリットとすることができる。

図5A及び図5Bを再度参照すると、ボディ102及び標本ホルダ100の窓部分110の厳密な輪郭に合致するようにフリット164を構成することにより、吸引圧力を窓104に効率的に与えることができる。また、真空フラスコ152に与えられる負圧は、窓を破壊したり該窓をボディ102から引き剥がしたりすることはない。従って、真空出口156を通して吸引することにより真空が与えられた場合には、標本ホルダ100の窓104が焼結ガラス製のフリット164の表面に緊密に引き付けられるだけである。

サスペンション中の細胞は、ピペット(図示せず)の如き通常の手段によって、

窓の中央に付加することができる。段付きの開口107の上方部分108が設けられているので、細胞のサスペンションが窓104に付加される際に、標本ホルダ100のボディ102が濡れることはない。

液体媒体の中の細胞が窓104に加えられる際に、上記液体媒体及び溶解した成分は、真空圧によって、窓104の気孔を通して吸引される。窓104の気孔は適宜なサイズを有しているので、細胞は、窓104の表面に捕捉される。液体サスペンションは、液体媒体が窓104によって濾過されて標本ホルダを濡らすことなく真空フラスコの中に収集されるような流量で、窓104に加えられる。この新規な構成は、細胞の濃縮及び窓104への付加を同時に行うことを可能とする。従って、サスペンションを標本ホルダ100の窓に付加する前に、上記サスペンションの中の細胞を濃縮する必要はない。

真空濾過装置150の別の特徴は、窓104に対する細胞の付加、及び、そのような細胞の乾燥作業が、フラスコ152に負圧を与えることによって、同時に行われるということである。また、標本ホルダ100の窓104は、細胞の採集及び濃縮を迅速且つ廉価に行うことによって、スペクトル観察を行うための細胞の処理を容易にする。細胞が標本ホルダ100の窓104に付加された後に、そのような細胞は、赤外線分光分析法及び／又はラマン分光分析法を用いて分析さ

れる。

図4 A、図4 B、図5 A及び図5 Bを参照して、標本ホルダ100の特徴を詳細に説明する。標本ホルダ100のボディ102は、成型プラスチックから構成されるのが好ましい。しかしながら、他の方法も使用することができることを理解する必要がある。例えば、標本ホルダ100のボディ102は、紙又は板紙若しくは他の適宜な材料から形成することができる。窓104は、振動スペクトル分光法に必要な光学的な性質を有する適宜な材料から構成することができる。そのような材料は、多孔性である必要もある。気孔のサイズすなわち孔径の上限値は、細胞の直径よりも小さくなければならない。窓104用の適宜な材料の例は、ガラス、ポリエチレン、ポリプロピレン、及び、アルミナから成る不織布又は纖維質の微孔性ウエブである。

窓104は、ある用途に関しては薄くすることができ、また、他の用途に関しては厚くすることができる。その厚さは、実行すべき分析法のタイプによって課される光学的な制約、及び、分析される物質の性質に依存する。例えば、ポリエチレンから構成される窓は、中赤外線領域に強い振動バンドを有している。そのような窓が比較的厚くて2-3 mmの範囲にある場合には、使用できる中赤外線を十分に伝達しない。しかしながら、上記材料が比較的薄いシートで10乃至20  $\mu$ mの範囲にある場合には、そのような材料は、細胞及び組織の赤外線分光分析を行うのに優れた窓である。対照的に、窓としての厚いガラスの層は、近赤外線分光分析、ラマン分光分析又はラマン共鳴分光分析に何等問題を生ずることはない。

細胞を分析する前に、そのような細胞を洗浄して、分析されている細胞又は物質からのスペクトル反応に悪影響を及ぼす総ての物質を除去することができる。そのような細胞の洗浄は、任意の体積の洗浄液を有するピペットを用いて行うことができる。この洗浄工程は、望ましくない物質が細胞から洗浄によって除去されるまで、繰り返される。

細胞の定着は、細胞の振動スペクトル分光分析から良好な応答を得る方法を提供する。細胞を採取した直後にスペクトル観察が行われる構造においては、基本

的に、定着は使用されず、そうでない場合には、定着は好ましい方法である。しかしながら、幾つかの標本からの細胞を準備して分光計によって観察するまでそのまま放置する自動化された分析システム（例えば、大型の集中検査装置）においては、定着を用いて、多数の標本に対して分光法を上手く使用できるようになる。

分析すべき細胞の別の処理方法は、振動スペクトル分光法によって観察される準備が整うまで、そのような細胞を冷凍することである。一旦解凍すると、そのような細胞は、分析される時まで、低温で調製されて保持される。しかしながら、そのような操作は、細胞及び組織の赤外線分光分析又はラマン分光分析による観察を極めて煩雑にし且つ高価にする。

定着剤を細胞に加える場合には、そのような定着剤に基づくアーチファクトが存在しないようにするために、分光観察を行う前に定着剤を除去することが重要である。定着剤は、細胞が標本ホルダ100の窓104の上に捕捉された後に、

そのような細胞を望ましい範囲で洗浄することによって、除去することができる。すなわち、定着剤は、適宜な溶液で窓104を洗浄することによって、除去される。

子宮頸細胞を採取する際には、そのような細胞は、ブラシ又はスパチュラ（へら）によって子宮頸から搔き取られる。標準的な細胞学的スミアを準備する際には、ブラシ及び／又はスパチュラに付着した細胞をガラススライドの上に塗りつける。しかしながら、分光分析を行うためには、緩衝生理食塩水及び定着剤を収容するキャップ付きの瓶の中に、上記採取装置を入れる。上記密封した瓶を激しく振って上記細胞をブラシ及びスパチュラから分離させ、細胞を採取瓶の中の液体に懸濁させる。細胞のサスペンションを上記瓶から吸引して、標本ホルダ100の窓104に付加することができる。細胞が採取されている上記瓶から細胞を取り出すと、細胞は定着される。

細い針による吸引によって上記瓶から採取された細胞は、液体が充填されたシリンジの中に吸引される。このようにして採取された細胞は、標本ホルダ100の窓104に直接付加することができる。この作業は、数秒の細胞採取の間に行

うことができる。この様子は、図6に参照符号200で示されている。

図6においては、シリンジ202の液体208は、シリンジ202のプランジヤ210に正圧が作用した時に、針206を通してリザーバ204から排出される。細胞は、標本ホルダ100の窓104の上に置かれた後に、定着され、これにより、細胞に定着剤を添加し、更に、定着剤の中の細胞のサスペンションを窓104に付加するという中間的な工程を省略することができる。定着は、標本ホルダ100の窓104に定着剤を添加することによって行うのが好ましい。真空を遮断して、定着剤と細胞との間の接触時間を調節する。この期間の後、定着剤を除去するため真空にする。次に、過剰な定着剤を、適宜な洗浄液によって、真空下で細胞から洗浄除去する。また、定着が完了した後に、一連の洗浄工程を行って、定着剤を細胞から除去する。

本発明は、標本ホルダ100の窓104への細胞の迅速な付加を容易にすると共に、分光分析のための標本の準備を簡素化する。本発明は、また、スペクトル的に関心のない、あるいは、細胞の分光分析を阻害する可能性のある生物学的な

物質を標本ホルダ100から除去するユーザの能力を向上させる。これは、例えば、窓104の上の標本の中の粘液の量を減少させる場合に望ましい。ユーザは、この作業を、窓104の上に捕捉された細胞を大量の水又は通常の生理食塩水で繰り返し洗浄することによって、行うことができる。スペクトル的に関心のない「汚染物質」、又は、細胞のスペクトルを混乱させる恐れのある物質を除去する作業を簡素化する別の方法は、上述の汚染物質と反応する化学的な混合物で窓を洗浄することである。例えば、粘液を除去することが望ましい場合には、窓の上に捕捉された細胞を粘液溶解薬で洗浄して、そのような粘液を除去することができる。この点に関して、洗浄液と窓104の上に捕捉された細胞との間の接触時間は、付与する真空の強度を変化させることによって、調節することができる。この操作は、ポリエチレン、ポリプロピレン、又は、他の適宜な疎水性物質の場合のように、ボディが非湿潤性である場合に、特に価値がある。

本発明によれば、窓104の上に捕捉された細胞の準備は、所望の目的に対して変更することができる。表面分子から成る振動的に有用なプローブを含む溶液

を、窓の上に捕捉された細胞と反応させ、その後、細胞の分光分析を行う前に除去することができる。これは、細胞の所望のスペクトル的な特徴を強調又は抑制する手段を提供する。

また、本発明によれば、窓104の上の小さな細胞を大きな細胞から取り除くことができる。子宮頸細胞の標本は、血球を含むことが多く、そのような血球は、子宮頸上皮細胞のサイズに比較して、極めて小さい。窓104の孔径（気孔寸法）を適正に選択することによって、上皮細胞を血球から分離することができる。これは、汚染する多数の血球が存在する場合に、少量の上皮細胞の分光分析を向上させる。

上述の例は、比較的少量（例えば、1乃至2m1あるいはそれ以下）の体液の中の細胞を処理する際に応用できる。本発明は、大量の体液の中で極めて薄いサスペンションになっている細胞を処理する際にも等しく適用できる。これは、少數の細胞が存在している、尿、腹水、胸膜液、脳脊椎液の如き液体がリットル単位で存在する場合でも適用することができる。そのような大量の体液は、細胞を前処理することなく、あるいは、何等かの方法でそのような細胞を濃縮すること

なく、標本ホルダ100の窓104に容易に直接付加することができる。後に説明するように、数リットルまでの液体の全量、及び、大きな体積の中に懸濁した総ての細胞を標本ホルダ100の窓104に付加することができる。

図7を参照すると、大量の希薄な細胞サスペンションを処理する場合には、参考符号260でその全体を示す標本ホルダ及び真空濾過装置は、着脱自在な漏斗262を備えており、この漏斗は、標本ホルダ100のボディ102の頂面の溝106の中に設けられる。漏斗262は、ボディ102の溝106に嵌合する寸法を有する底縁部208を有している。この底縁部208から上方に隔離されているのは、漏斗262を取り扱うために使用される円形のフランジ266である。漏斗262は、細胞の漏洩及び損失を阻止する。

図8は、振動スペクトル分光分析を行うために細胞を窓304に付加して濃縮するための装置の第2の実施例を参考符号300で示している。図8においては、窓304は、フィルタホルダ302のボディ308に永続的に取り付けられる

のではなく、自由であって、フィルタホルダ302に挿入される。窓304は、フィルタホルダ302の中に設けられており、該フィルタホルダ302は、使用後に開いて窓304を取り出せるようになっている。フィルタホルダ302は、適宜な材料から形成することができる。

フィルタホルダ302は、フリット308及びキャップ314を備えるのが好ましい。これらフリット及びキャップは、成型プラスチックから形成されるのが好ましい。キャップ314は、中空の部材を有しており、この中空の部材は、頂部から上方に伸長している。キャップ314及びフリット308は、密封可能に且つ着脱自在に嵌合する。フィルタホルダ302は、窓304を適所に保持して、正圧が作用した時に窓が引き剥がされるのを防止している。

図8を参照すると、窓304は、フリット308の上に設けられている非多孔性のフレーム312によって包囲されている。フレーム312は、窓304の上に収集された細胞を小さい面積に制限し、細胞が装填された後の窓304の操作を容易にしている。

図9は、フリット308の平面図を示している。フリット308は、窓304の下方に設けられていて、フラスコ152に流体連通する複数の開口310を有

している。

キャップ314の頂部から上方に伸長している上記部材は、ルーエロック322又は他の適宜な取り付け機構を介して、シリジ320に接続されている。プランジャ324が、シリジ320の頂端部に設けられていて、細胞を含む液体を窓304に向かって下方へ押し出すようになっている。より詳細に言えば、シリジ320の筒部の中の液体媒体の中に懸濁している細胞は、シリジ320のプランジャ324に正圧を加えて、フィルタホルダ302の中に保持された窓304によってサスペンションを濾過することにより、窓の上に採集される。この操作を行った後に、窓304の非多孔性の枠312を掴むことによって、細胞が付着した窓304をフィルタホルダ302から取り外す。フィルタホルダ302は、該フィルタホルダがプラスチック又は他の廉価な材料から形成されている場合には、廃棄され、また、ステンレス鋼又は他の高価な材料から形成されてい

る場合には、洗浄して再使用することができる。

捕捉された細胞を有する窓304は、図11A及び図11Bに示す使い捨て可能な標本ホルダ350のボディ352に装着される。図11Aは、標本ホルダの平面図を示しており、また、図11Bは、その底面図を示している。窓304を標本ホルダ354のボディ352に装着するための他の方法を用いることができる。例えば、窓304をスチール製の標本ホルダに磁気的に装着することができる。

捕捉された細胞を有する窓304は、フィルタホルダ302から取り外され、赤外線透過性のサポート380に入れられる。図10に示すこの透過性のサポートは、結晶質のCaF<sub>2</sub>又は他の結晶質の赤外線透過性の物質から形成されるのが好ましい。窓304及びサポート380は、標準的な赤外線標本ホルダ354に装着することができる。

図12を参照すると、子宮頸細胞をブラシ又はスパチュラから取り除くためのアセンブリが示されている。変形されたシリンジ400の筒部402からプランジャを取り外した状態で、細胞が付着しているブラシ又はスパチュラを上記筒部の中の液体媒体の中に入れる。キャップ406を筒部402の頂部に置き、上記アセンブリを振って、細胞を採集装置から流体媒体の中に落とす。キャップ40

6を取り除き、採集装置を筒部402から取り出す。次に、シリンジにプランジャ404を嵌合させる。プランジャ406を用いて、細胞を含む流体媒体に正圧を加える。

細胞を採集して濃縮するための装置の第3の実施例が、図13に示されている。この実施例は、シリンジ400(図12)の底部を穿刺するようにキャップ314に取り付けられた金属の導管を有している。シリンジ400のプランジャ404に正圧を加えると、液体媒体の中の細胞が窓304に付加される。また、サスペンション中の子宮頸細胞、あるいは、適宜なタイプの採集管の中の他の任意のタイプの細胞が、標準的なシリンジの中に吸引される。次に、標準的なシリンジを図8に示すようにフィルタホルダ302に取り付け、サスペンション中の細胞をフィルタホルダの中に保持された窓に付加する。

図4 A、図4 B、図5 A及び図5 Bに示す本発明の実施例に関して説明したい。細胞の操作方法も、図8乃至図13の実施例に応用することができる。例えば、細胞は、フィルタホルダの中の窓に捕捉された後に、シリンジを交換して上記窓を適宜な定着剤で処理することにより、定着させることができる。図8乃至図13に示すフィルタホルダ及びシリンジ装置は、定着された細胞と共に使用することができる。定着された細胞を用いる場合には、シリンジを適宜な洗浄液に変えることによって、残留する定着剤を細胞から洗浄除去する。また、定着剤、あるいは、使用する可能性のある他の試薬が、細胞を加えるシリンジの中に存在することがある。

図14の参照符号500を参照して、本発明の装置及び方法（自動的及び半自動的な）を説明する。強烈に振とうして細胞を採取装置から採取装置502中の液体サスペンション552の中へ移動させた後に、参照符号500でその全体が示されている装置を用いて、手動操作によってあるいは自動的に細胞を収集し且つ濃縮して分析を行う。管506の第1の端部509は、採取装置502の中の液体サスペンション552の中に位置している。ポンプ516が、管506の中で矢印「A」の方向に液体媒体を流す。細胞は、管506の端部507から標本ホルダ530の窓532へ供給される。フラスコ520の中の真空圧が、上記細胞に伴っていた液体を窓及びフリットを通してフラスコの中に吸引する。この作用は、自動的に行われる。自動操作を行うための吸引速度は、濾過速度に実質的に一致するのが好ましいが、吸引速度を濾過速度よりも遅くして、細胞がこぼれたり無駄になるのを防止することができる。細胞の全て又は一部がこのようにして窓532に加えられる。付加すべき細胞の量は、吸引体積を制御する装置によって調節することができる。装置のこの特徴でさえ、自動的に制御することができ、そのような自動的な制御は、窓に付加される細胞の量を調節するために特に有用である。

図14を参照すると、吸引ピペット506と標本ホルダ530の窓532との間の流路の吸引される流れが、適宜な光学的なウィンドによって、連続的に監視されている。ウィンド512は、視覚的に、あるいは、参照符号540、542

で示すセンサを介して、観察することができる。この点に関して最も簡単な方法である本発明の好ましい実施例においては、光散乱によって濁度を監視する。流れの中の細胞状物質の量を監視する他の方法は、例えば、タンパク質又はDNAの吸収によって行うことであるが、光散乱は、短い波長において効果がある。標本ホルダ530の窓532へ流れる流れの中の細胞状物質の量を監視するために使用される光学的な方法とは別に、組み込み型のプログラムが、吸引する流速と濁度（あるいは、他の光学的な性質）の測定値とを関連づけて、最適な数の細胞を有する標本を窓532の上に得るために窓532に付加すべきサスペンションの体積を計算する。この体積の細胞が付加された後に、吸引を停止する。

サスペンションの中の細胞を均一に分布させるために、振とうして細胞を採集装置から移動させた後に、ショ糖又は他の適宜な物質を添加することによって、採集液体を高い密度に維持する。採集液体の密度を高めて細胞の沈降速度を低下させるためにどのような物質を用いた場合でも、そのような物質は、必要な数（濁度の測定値に基づく）の細胞を窓532に付加した後に、窓から洗浄除去されなければならない。不適当な数の細胞が付加された場合には、総てのサスペンションを吸引した後に、装置は、そのような状態を示すプリントアウト、フラッシュ灯あるいは他の適宜な警報（図示せず）を与えることができる。

大型の臨床病理学検査装置においては、完全に自動的な標本準備を行うことができる。そのような作業においては、細胞を収容する瓶が自動的に振とうされる。

2つの標本ホルダ（一方は、子宮頸内の標本用であり、他方は、子宮頸外の標本用である）には、同じ識別コードが自動的に押印される。次に、子宮頸内及び子宮頸外の細胞のサスペンションを吸引して、適宜な窓に付加する。各々の基板に付加される細胞の数の制御は、上述のようにまた図14に示すように行われる。細胞を付加した後に、上述のように、細胞を洗浄するための及び／又は定着剤で細胞を処理するための、並びに、細胞に特定の変更を与えるための特定の化学的な処理を行うためのルーチンが実行される。

図4においては、標本ホルダ100の窓104は、約3mmの直径を有するの

が好ましい。標準的な赤外線分光分析における光ビームは、1. 3 mm程度まで減少される。顕微鏡のアタッチメントを用いると、回折効果の限界まで、より小さな光ビームを得ることができる。中赤外線においては、回折限界は、単一の細胞の寸法よりも大きい。しかしながら、近赤外線においては、細胞の寸法の光ビームを生ずることができ、そのような光ビームもラマン散乱による分光分析に適用することができる。

一般的に、細胞に集中されたスペクトルは、ある標本の中の総ての細胞の平均スペクトルを表す。細胞の中の病気を検知して病気の重大性の段階を決める振動スペクトル分光分析の能力は、複数の細胞を一時に観察することによって、最大化することができる。そのようにするために、上述の細胞が窓の表面にわたって広がるように、窓に付加することを必要とする。本発明によれば、窓への細胞の付加は、調節された状態で細胞を窓に付加する方法を提供し、これにより、最小数の細胞に関して一時に、あるいは、一つの細胞に関して一時に、振動スペクトルを同時に収集することができる。そのようにするために、サスペンションの中の吸引された細胞を図14に示すように窓に付加する。

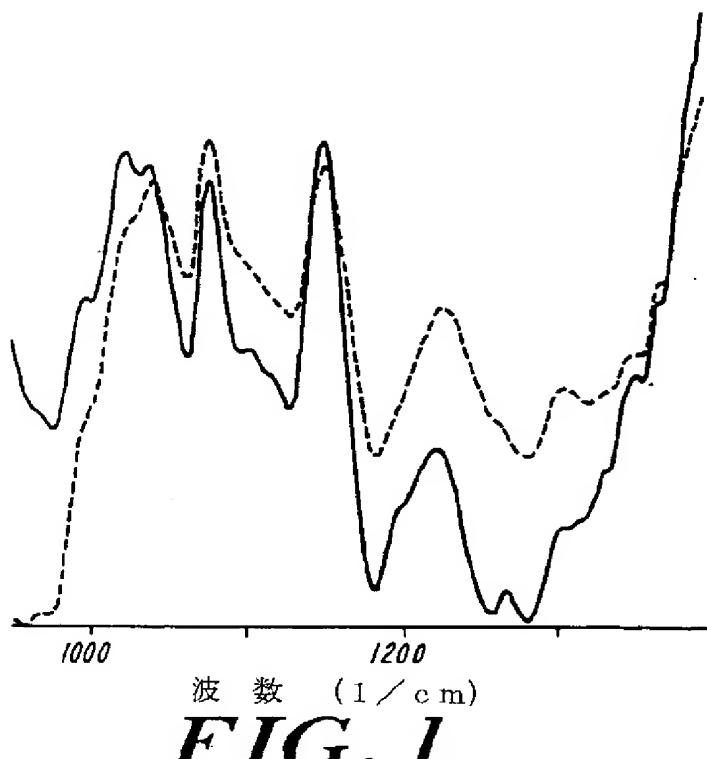
液滴のサイズ（サスペンションの中の細胞の濃度に一部依存する）、及び、その窓の上での位置に関する液滴状の付加は、窓の水平方向及び垂直方向にわたってピペットの先端を小さな増分（例えば、1  $\mu$  m）で駆動するコンピュータソフトウェアによって、制御される。一時に付加される液体の量は小さく、窓にわたって広がることができないので、細胞は、堆積した場所で「膠着」する。そこで、細胞を液滴の状態で洗浄するあるいは上述のように細胞を処理するための基準と

して、細胞が堆積する窓の座標を用いる。最後に、窓の上の細胞の位置の座標を、顕微鏡の光学系を有する分光計にオンラインで供給する。この分光計は、窓の表面の複数の領域を横断して移動してそのような領域をサンプリングする各々の座標から、インターフェログラム（interferogram）を収集して積算する。このように、ソフトウェアは、窓の上の細胞の位置に関して記憶された座標に基づいて、収集を指揮する。積算された各々のスペクトルは、窓全体が（場合によって

は細胞毎に) 走査されるまで、あるいは、病気の診断を確定することができるまで、別個に、且つ、窓の走査と同時に、分析される。

本明細書に使用する用語及び表現は、説明のためのものであって、限定的なものではない。そのような用語及び表現を用いる際には、図示の及び説明した特徴の均等物又はその一部を排除する意図はなく、本発明の範囲内で種々の変更を行うことが可能であることを認識する必要がある。

【図1】



【図2】

**FIG. 2**

【図3】

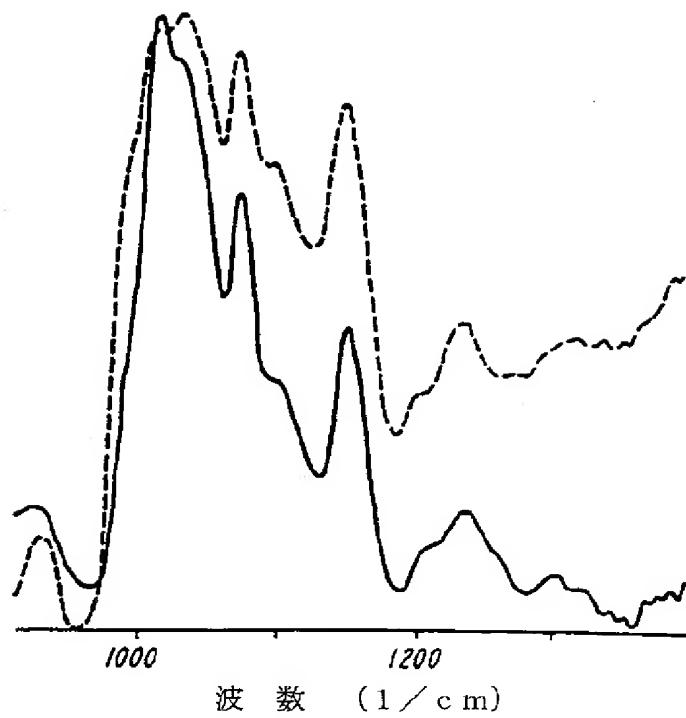


FIG. 3

【図4】

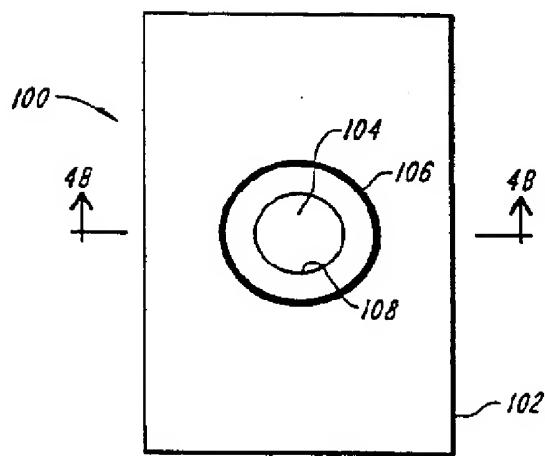


FIG. 4A

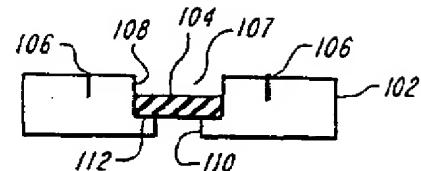


FIG. 4B

【図5】

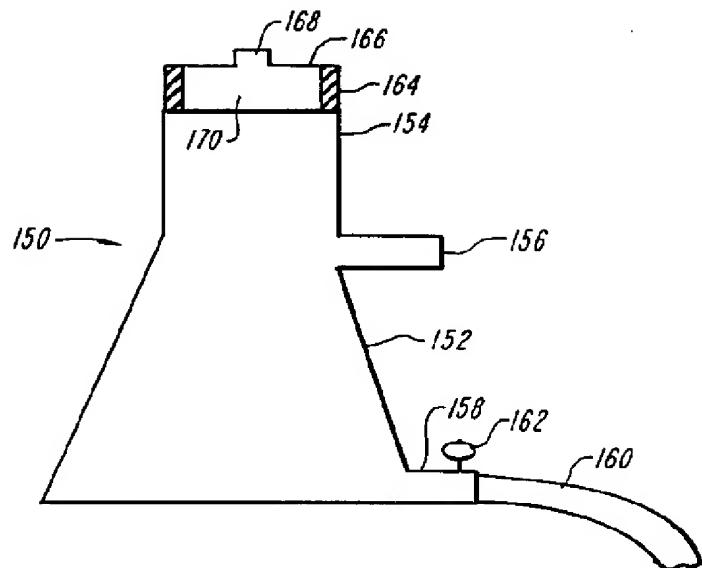


FIG. 5A

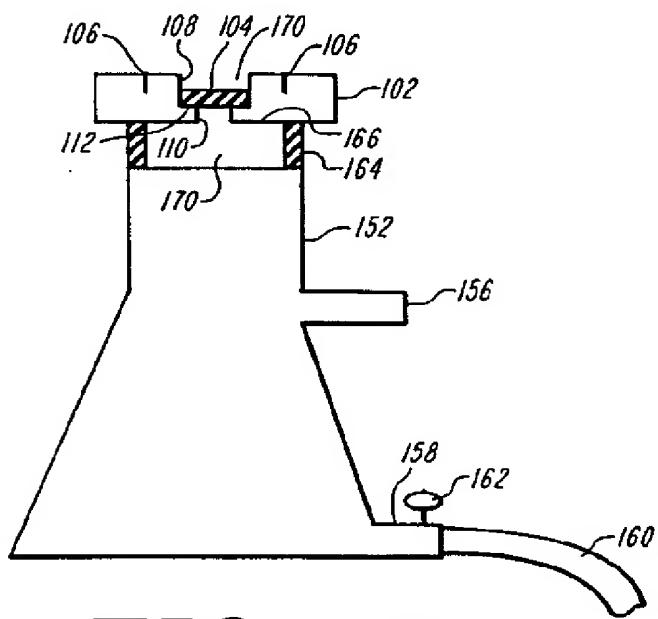


FIG. 5B

【図6】

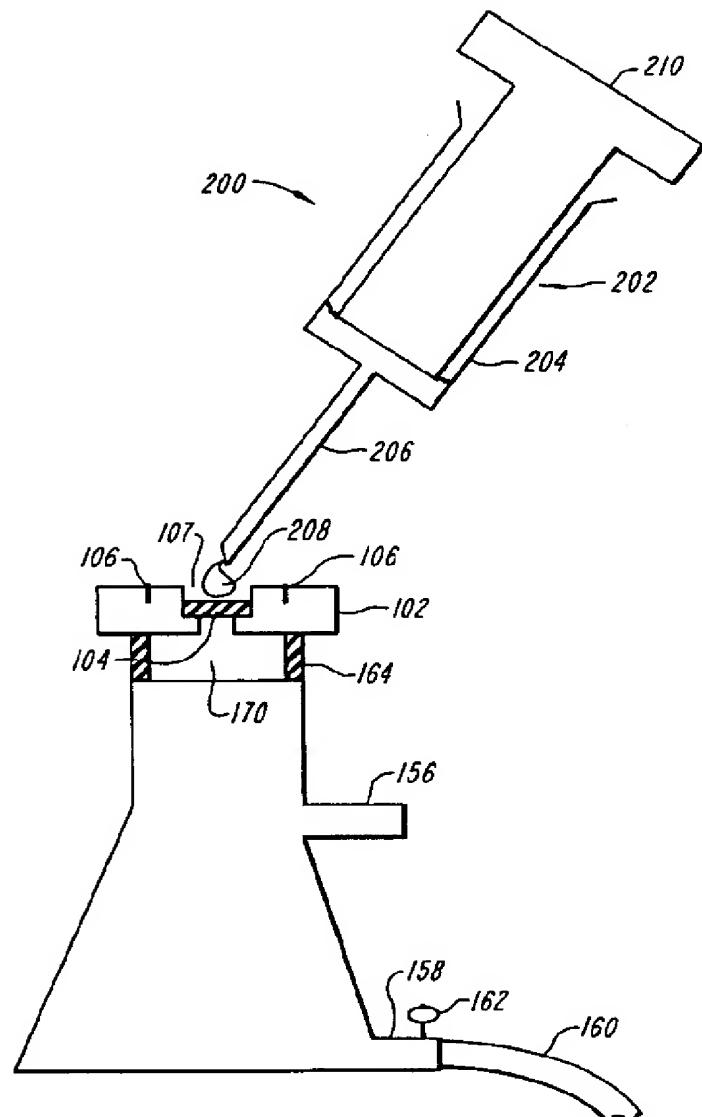
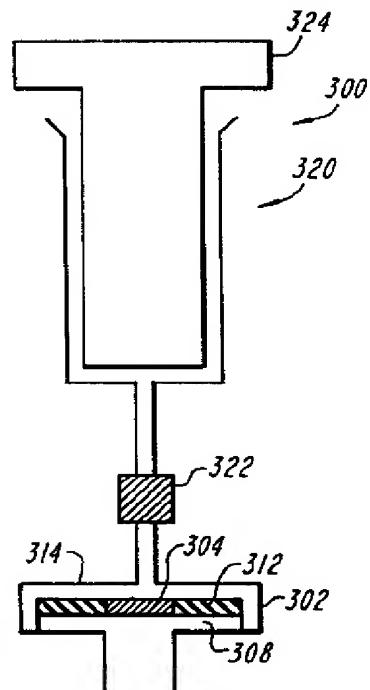
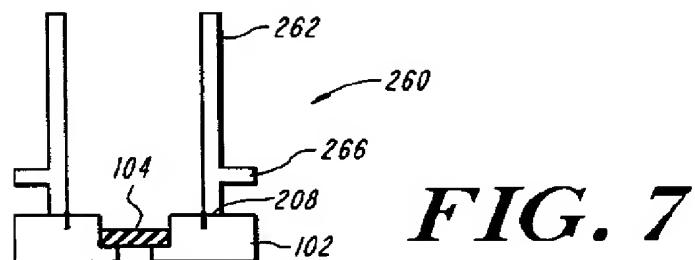


FIG. 6

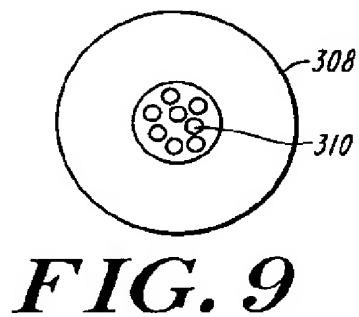
【図8】



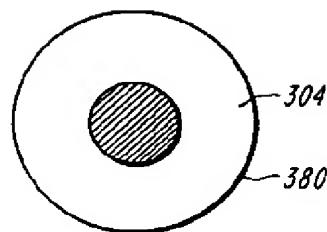
【図7】



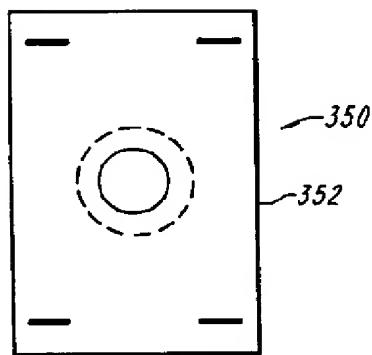
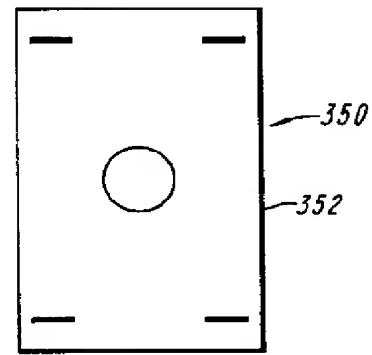
【図9】



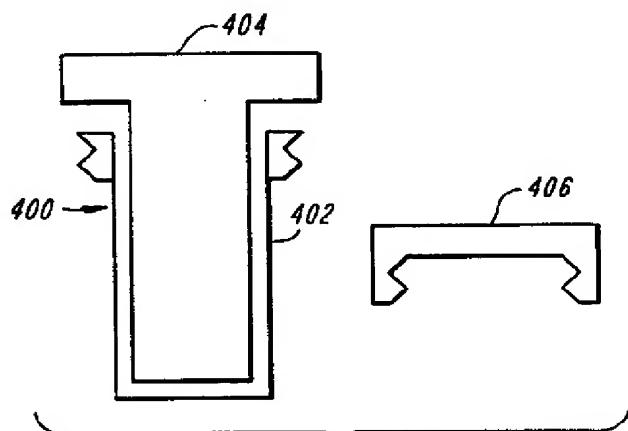
【図10】

***FIG. 10***

【図11】

***FIG. 11A******FIG. 11B***

【図12】

***FIG. 12***

【図13】

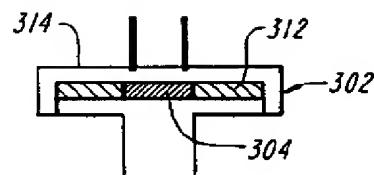


FIG. 13

【図14】

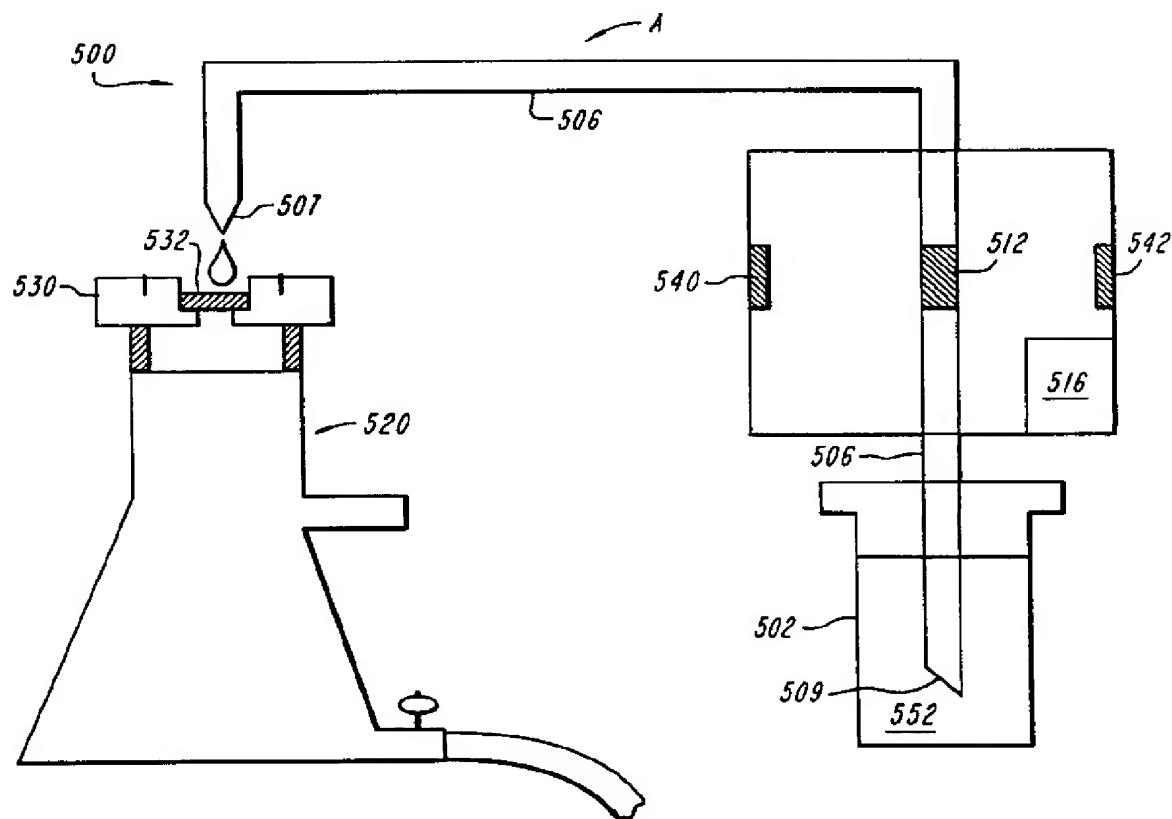


FIG. 14

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.  
PCT/US 96/09304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N21/35		
A. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,5 408 306 (ANDERSON) 18 April 1995 see abstract see column 4, line 49 - line 60	1,3
X	see column 5, line 30 - line 40 see column 5, line 45 - line 51 see figures 3,4	2
Y	US,A,3 521 963 (BADER) 28 July 1970 see column 4, line 41 - line 48 see column 4, line 55 - line 61 see figures	1,3
A	WO,A,90 15981 (UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 27 December 1990 see page 1, line 7 - line 18 see page 7, line 22 - line 26 see page 8, line 9 - line 13 see figures 9,10; examples 6,7	1-3
	---	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  30 September 1996		Date of mailing of the international search report  09.10.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3818 Patentsean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Thomas, R.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 96/09304

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO,A,93 00580 (MINNESOTA MINING) 7 January 1993</p> <p>see abstract</p> <p>see page 20, line 34 - page 21, line 21; claim 30</p> <p>-----</p>	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 96/09304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-5408306	18-04-95	NONE		
US-A-3521963	28-07-70	NONE		
WO-A-9015981	27-12-90	DE-D- 69004430	09-12-93	
		DE-T- 69004430	17-03-94	
		EP-A- 0478596	08-04-92	
		JP-T- 4506402	05-11-92	
WO-A-9300580	07-01-93	AU-A- 2304592	25-01-93	
		CA-A- 2103446	26-12-92	
		EP-A- 0591417	13-04-94	
		JP-T- 7500180	05-01-95	
		US-A- 5470757	28-11-95	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 F I  
// G 0 1 N 33/48 G 0 1 N 33/48 P

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L  
U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F  
, C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E,  
S N, T D, T G), A P (K E, L S, M W, S D, S  
Z, U G), U A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D  
, R U, T J, T M), A L, A M, A T, A U, A Z  
, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C Z,  
D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, H U, I  
L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L K  
, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K,  
M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R  
U, S D, S E, S G, S I, S K, T J, T M, T R  
, T T, U A, U G, U S, U Z, V N